

JÄTEVESIEN BIOPUHDISTUKSESSA KÄYTETTYJEN PAJUN JUURTEN
MIKROBIYHTEISÖT

KAROLIINA ISO-JUNNO

Pro gradu -tutkielma
Oulun yliopisto
Luonnontieteellinen tiedekunta
Ekologian ja genetiikan tutkimusyksikkö
2019

OULUN YLIOPISTO

Luonnontieteellinen tiedekunta, ekologian ja genetiikan tutkimusyksikkö

ISO-JUNNO, KAROLIINA: Jätevesien biopuhdistuksessa käytettyjen pajujen juurten mikrobiyhteisöt

Pro gradu -tutkielma (40 op), 87 s., liitteitä 2

Joulukuu 2019

Pajuilla (*Salix*) on pitkä ja monipuolinen jalostushistoria pohjoisessa, ja ominaisuuksiensa vuoksi ne soveltuvat hyvin jätevesien bioremediaatioon eli ylimääräisten ravinteiden ja epäpuhtauksien poistoon. Haasteena on kuitenkin löytää tehokkaita pohjoiseen ilmanalaa soveltuvia biopuhdistavia lajikkeita. Tässä työssä selvitettiin Kuusamon Torangissa toimivan yhdyskuntajäteveden puhdistuskosteikkoon istutettujen pajulajikkeiden juurten bakteeri- ja sieniyhteisöjen koostumusta. Kosteikolla ja kontrollialueella kaksi kasvukautta kasvaneista pajuista punnittiin laboratoriossa maanpäällinen kuivabiomassa ja selvitettiin juuriston mikrobiyhteisö uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä hyödyntäen. Pajujen juurten mikrobiyhteisöjen eroja vertailtiin neljän pajulajikkeen (Gudrun, Karin, Klara ja Torangin maatiainen), pajukosteikon ja kontrollialueen, sekä hyvin (korkea biomassa) ja huonosti (alhainen biomassa) kasvaneiden pajunäytteiden välillä.

Tulosten perusteella pajujen mikrobiyhteisöt koostuivat pääosin juurissa yleisesti tavattavista ryhmistä, bakteereista suurimpina proteobakteerit, acidobakteerit, aktinobakteerit, Bacteroidetes ja Chloroflexi, sekä sienistä kotelo- ja kantasienet. Pajujen mikrobiyhteisöt erosivat diversiteettianalyysien perusteella eniten eri pajulajikkeiden bakteeriyhteisöjen suhteen ja erityisesti Gudrun-lajikkeella oli korkea lajirikkaus ja monimuotoisuus. Koealueella havaittiin runsaampana useita taksonomisia bakteeriryhmiä, kuten Chloroflexi, Burkholderiaceae ja Sphingomonadales, joilla on aiemmissa maaperä- ja juuristotutkimuksissa todettu yhteyttä epäpuhtauksien ja ravinteiden poistoon. Kontrollialueella esiin nousivat esimerkiksi orgaanista ainesta hyödyntävät lahottajasienet, joita havaittiin runsaimmin Karin ja Klara-pajulajikkeilla. Kaikkiaan merkitsevästi eroavia taksoneita havaittiin selvästi enemmän bakteeriyhteisöistä kuin sieniyhteisöistä, joista nousi esiin vain muutama taksonominen ryhmä.

Pajujen juurimikrobistoa ja sen merkitystä puhdistuksen onnistumiselle ei ole juuri tutkittu biopuhdistusolosuhteissa maastossa. Työ vahvisti pajuilla olevan paljon puhdistuskosteikoilla hyödyllisiä taksonomisia mikrobiryhmiä. Lajikkeista Gudrunia voidaan pitää tutkimuksen perusteella mikrobistoltaan parhaiten tämänkaltaiseen puhdistusympäristöön sopeutuvana pajulajikkeena, mutta myös Karin ja Klara -lajikkeet vaikuttavat hyviltä.

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	3
1.1	Vesien epäpuhtaudet	5
1.2	Jäteveden käsittely.....	5
1.3	Juuristomikrobit	6
1.3.1	Mikrobien merkitys.....	7
1.3.2	Mikrobiyhteisöjen muodostuminen ja yhteisörakenteeseen vaikuttavat tekijät ..	8
1.3.3	Mikrobiyhteisöjen tutkimus molekyyliomenetelmillä	9
1.4	Pajut ja niiden käyttö biopuhdistuksessa.....	11
1.5	Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit.....	11
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	13
2.1	Tutkitut pajulajikkeet	13
2.2	Tutkimusalue.....	14
2.3	Pajunäytteiden valinta ja juurten esikäsittely	18
2.4	Juurten mikrobiyhteisön DNA:n eristys, monistus ja sekvensointi	20
2.5	Bioinformatiikka	21
2.6	Tilastolliset analyysit.....	24
3	TULOKSET.....	26
3.1	Pajujen biomassa	26
3.2	Bakteeriyhteisöt.....	27
3.2.1	Bakteeriyhteisöjen taksonomia	27
3.2.2	NMDS-yhteisöordinaatio	29
3.2.3	Bakteeriyhteisöjen monimuotoisuus	30
3.2.1	Bakteeritaksonien suhteellinen runsaus eri käsittelyissä, pajulajikkeilla ja korrelaatio versobiomassan kanssa.....	33
3.2.2	Bakteeriyhteisön koostumuksen runsausanalyysit.....	35
3.2.3	Bakteeriyhteisöjen toiminnallinen potentiaali (PICRUST2).....	37
3.3	Sieniyhteisöt.....	37
3.3.1	Sieniyhteisöjen taksonomia ja toiminnalliset ryhmät	37
3.3.2	NMDS-yhteisöordinaatio	40
3.3.3	Sieniyhteisöjen monimuotoisuus	41
3.3.4	Sienitaksonien ja toiminnallisten ryhmien suhteellinen runsaus eri käsittelyissä, pajulajikkeilla ja korrelaatio biomassan kanssa.....	41
3.3.5	Sieniyhteisöjen koostumuksen runsausanalyysit	42
4	POHDINTA.....	44
4.1	<i>Bakteerien ja sienten toiminnalliset ryhmät.....</i>	44
4.2	<i>Pajulajikkeiden väliset erot juurten mikrobiyhteisöissä</i>	46

4.3	<i>Puhdistuskosteikon ravinteisuuden ja kosteuden vaikutus juurten mikrobiyhteisöön ..</i>	47
4.4	<i>Raskasmetallien ja orgaanisten epäpuhtauksien poistoon liittyvät mikrobit.....</i>	50
4.5	<i>Pajujen versobiomassan suhde juurten mikrobiyhteisöihin.....</i>	51
4.6	<i>Aineiston luotettavuus</i>	52
4.7	<i>Ehdotuksia jatkotutkimukseen</i>	53
5	JOHTOPÄÄTÖKSET	54
	KIITOKSET.....	55
	KIRJALLISUUS.....	56
	LIITTEET	69
	Kuvat ja taulukot	69
	QIIME2-scriptit.....	83

1 JOHDANTO

Ihmisen aiheuttama vesien saastuminen on jo maailmanlaajuinen ongelma (Schwarzenbach ym. 2006). Yli kolmasosa maapallolla saatavilla olevasta uusiutuvasta makeasta vedestä on maatalouden, teollisuuden tai kotitalouksien käytössä aiheuttaen myös luonnonvesien likaantumista lukuisilla synteettisillä tai luonnosta peräisin olevilla yhdisteillä (Schwarzenbach ym. 2010). Merkittäviä saastelähteitä ovat myös kaivostoiminta, jätemaiden käyttö täyttömaina, sekä rakennettujen ympäristöjen, kuten kaupunkien sade- ja sulamisvedet eli hulevedet, jotka kuljettavat pintojen epäpuhtauksia vesistöihin (Schwarzenbach ym. 2010; Kokko 2017). Valumien mukana tulevat ravinteet, kuten typpi (N) ja fosfori (P) lisäävät vesistöjen rehevöitymistä ja monet kemialliset yhdisteet (esim. polyklooratut bifenyylit) tai raskasmetallit (esim. kadmium, elohopea ja lyijy) voivat kulkeutua ravintoketjussa eteenpäin aiheuttaen haittaa sekä ihmisille että muille eliöille (Schwarzenbach ym. 2010; Dorne ja Fink-Gremmels 2013).

Vesien puhdistukseen ja jäteveden kierrätykseen on kehitelty monipuolisesti erilaisia fysikaalisia ja kemiallisia teknologioita (Gupta ym. 2012). Epäpuhtauksien täydellinen poistaminen jätevedestä on kuitenkin kallista ja haastavaa ja luontoon päästettävä käsitelty jätevesi sisältää edelleen matalina pitoisuuksina haitallisia yhdisteitä (Vieno 2014). Vedenpuhdistuksen puhdistustehon parantamisessa, sekä saastumisen ehkäisyssä ja saastuneen luonnon puhdistamisessa voidaan hyödyntää kasveja ja mikrobeja, jotka kykenevät hajottamaan orgaanisia ympäristömyrkyjä kuten polykloorattuja bifenyylejä (PCB) ja poistamaan epäorgaanisia aineita, kuten typpeä ja fosforia tai raskasmetalleja (Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg, U) kiinteästä ja nestemäisestä kasvualustasta, sekä ilmasta (Postila ym. 2018; Salt ym. 1998; Schwarzenbach ym. 2010; Passatore ym. 2014). Kasveja hyödyntävää tekniikkaa kutsutaan fytoimediaatioksi ja se voidaan luokitella eri alalajeihin puhdistustarpeesta ja -kohteesta riippuen. Esimerkiksi fytoekstraktiossa kasveista otetaan sadonkorjuussa talteen epäpuhtauksia sisältäviä kasvinosia, joihin kasvit ovat kuljettaneet metalleja tai orgaanisia aineita maaperästä. Fytodegradaatiossa kasvi hajottaa orgaanisia yhdisteitä symbionttisten tai juurten läheisyydessä elävien mikro-organismien avulla. Ritsofiltraatiossa kasvien juuret absorboivat vedestä ja vesipitoisista jätevirroista saasteita, pääasiassa metalleja. Kasveja voidaan käyttää myös saasteiden haihduttamiseen, ympäristössä haitallisuuden alentamiseen ja ilmasta poistamiseen (Salt ym. 1998).

Jätevesien käsittelyyn hyväksi todettuja fytoimediaation muotoja ovat tehokkuuden, edullisuuden ja helppouden kannalta erilaiset vedenpuhdistuskosteikot. (Kivaisi 2001; Salt ym. 1998). Kosteikkojen toiminta perustuu pääosin fytoekstraktioon ja ritsofiltraatioon, mutta myös fytodegradaatioon. Puhdistuskosteikoilla maailmanlaajuisesti hyödynnetyimpiä lajeja ovat järviruoko eli ryti (*Phragmites australis*), sekä monet kaislalajit (*Scirpus*) ja osmankäämit (*Typha*) (Vymazal 2011b). Muun muassa Suomessa on tarkasteltu myös pajukasveja (*Salicaceae*), joilla on jalostus- ja viljelytaustaa myös energiakasveina (Niemi 2014).

Biopuhdistukseenkin vaikuttavilla mikrobeilla tarkoitetaan yleensä arkeonien (ent. arkit) ja bakteerien domeeneja, sekä aitotumaisten domeenin mikroskooppisia organismeja kuten alkueliöitä, yksisoluisia leviä ja osaa sienistä (Martiny ym. 2006). Mikrobit ovat läsnä kaikkialla ja ne ovat olennaisia ekosysteemien eli eliöyhteisöjen toiminnalle (DeLong ja Pace 2001). Mikrobeja tutkitaan paljon esimerkiksi vesistöissä, maaperässä, kasveilla ja eri eliöillä (DeLong ja Pace 2001; Wu ym. 2019). Maaperässä kasveilla juuria ympäröivä vyöhyke, ritsosfääri, on aktiivista aluetta, jossa tapahtuvat kasvien, mikro-organismien, maaperän ja saasteiden väliset fysikaaliskemialliset ja biologiset prosessit (Stottmeister ym. 2003).

Kasvien kanssa juuriston alueella toimivia bakteeri- ja sienisymbiontteja on paljon (Yang ym. 2013). Juurisienet eli mykorritsat vaikuttavat kasvien menestymiseen erityisesti ravinteiden ja veden ottoa edistämällä, sekä suojaamalla juuristoa patogeenisilta eli tauteja aiheuttavilta mikrobeilta ja myös raskasmetalleilta (Van der Heijden 2001). Bakteerit voivat edistää kasvin kasvua muun muassa syntetisoimalla kasvihormoneja, helpottamalla ravinteiden, mm. typen ja fosforin ottoa maaperästä tai vähentämällä ja estämällä kasvitauteja esimerkiksi tuottamalla patogeenisten sienten seiniä hajottavia entsyymejä (Hayat ym. 2010).

1.1 Vesien epäpuhtaudet

Epäpuhtaudet vesissä voidaan luokitella epäorgaanisiin, orgaanisiin ja biologisiin. Yleisimpiä epäorgaanisia saasteita ovat myrkylliset ja karsinogeeniset raskasmetallit, kuten kromi (Cr), nikkeli (Ni), kupari (Cu), sinkki (Zn), kadmium (Cd), lyijy (Pb), elohopea (Hg) ja uraani (U) (Gupta ym. 2012; Schwarzenbach ym. 2010). Näiden lisäksi vakavia haittoja aiheuttavia epäorgaanisia yhdisteitä ovat suurina pitoisuuksina muun muassa sulfaatit, fluoridit, kloridit ja oksalaatit, sekä typpeä sisältävät nitraatit ja fosforia sisältävät fosfaatit (Gupta ym. 2012). Myrkylliset orgaaniset epäpuhtaudet ovat peräisin esimerkiksi torjunta-aineista, jotka sisältävät hyönteismyrkkyjä tai rikkakasvien ja sienitautien torjunta-aineita, kuten polynukleaarisia hiilivetyjä (PAH), fenoleita, polykloorattuja bifenyylejä ja monia muita haitallisia aineita. Biologisia epäpuhtauksia taas ovat esimerkiksi tauteja aiheuttavat selkärangattomat, mm. madot ja planktoneläimet, sekä haitalliset mikrobit kuten bakteerit, sienet, levät, amebat ja virukset (Gupta ym. 2012). Vedessä epäpuhtaudet ovat joko liuenneina (solvatoituneina liuotteen ionien sähköstaattisesti ympäröimänä), kolloidisina (nesteeseen hienojakoisesti jakautuneena) tai suspendoituneina (kiinteän aineen ja nesteen hitaasti saostuvana seoksena) (Gupta ym. 2012; Hienonen 2007).

1.2 Jäteveden käsittely

Koska maapallon vesivarannot ovat rajoitetut, erilaiset vedenpuhdistus- ja kierrätysmenetelmät ovat ainoa vaihtoehto puhtaan veden saamiseksi tulevana vuosikymmeninä. Tämä tuo paineen kehittää uusia edullisia ja nopeita jätevedenkäsittely- ja uudelleenkäyttötekniikoita (Gupta ym. 2012). Vesien puhdistukseen valittu käsittelyteknologia riippuu jäteveden tyypistä ja puhdistusvaatimuksista. Puhdistusprosessit voidaan jakaa primaarisiin, sekundaarisiin ja tertiäärisiin teknologioihin. Esikäsittelyn (seulonnan) jälkeen primaarinen käsittely sisältää pääosin fysikaaliskemiallista puhdistusta, jonka tarkoituksena on poistaa vedestä mm. isoimpia kiinteitä partikkeleita. Sekundaarinen käsittely on biologinen hyödyntäen mikrobeja aerobisesti ja anaerobisesti. Tertiäärisiä prosesseja käytetään tarvittaessa primaaristen ja sekundaaristen prosessien jälkeen veden saamiseksi esimerkiksi juomakelpoiseksi tai teollisuuden ja lääketieteen tarpeisiin sopivaksi (Gupta ym. 2012).

Osa jätevedenpuhdistusteknologiaa ovat myös rakennetut vedenpuhdistuskosteikot, joiden avulla vedestä voidaan poistaa erityisesti ylimääräisiä ravinteita tai raskasmetalleja, sekä hajottaa orgaanisia yhdisteitä, kuten polykloorattuja bifenyylejä tai fenoleita (Vymazal 2014; Passatore ym. 2014; Sánchez-González ym. 2019). Rakennetut vedenpuhdistuskosteikot

voidaan luokitella neljään eri tyyppiin hydrologian eli veden virtaaman perusteella. Nämä eri rakennetyypit ovat pintavirtauksen kosteikot, pinnanalaisen vaakasuoran virtauksen kosteikot, pinnanalaisen pystysuoran virtauksen kosteikot ja hybridikosteikot. Kuitenkaan kosteikot eivät useinkaan sovellu puhdistukseen yksistään, vaan jäteveden laadusta riippuen ennen kosteikkoa tarvitaan esikäsittely eri puhdistustekniikoilla. Erityisesti esimerkiksi teollisuuden jätevedet sisältävät erittäin korkeina pitoisuuksina orgaanisia aineita, suspendoituneita aineita, ammoniakkia ja muita epäpuhtauksia (Vymazal 2014). Nykypäivänä monenlaisten eri jätevesityyppien käsittelyyn soveltuvia rakennettuja kosteikkoja pidetään luotettavana jätevedenkäsittelyteknologiana ja niitä hyödynnetään maailmanlaajuisesti (Vymazal 2011a; 2010).

1.3 Juuristomikrobit

Kasvit ovat vuorovaikutuksessa bakteerien, arkeonien, alkueliöiden ja sienten kanssa (Martiny ym. 2006; Yang ym. 2013). Mikrobit kolonisoivat kaikkien kasvinosien pinta- ja sisäosien solukoita muodostaen yhteisöjä (Hardoim ym. 2015; V. Kumar ym. 2016). Mikrobit ja niiden muodostamat yhteisöt voivat vaikuttaa kasvin fysiologiaan positiivisesti tai negatiivisesti erilaisilla mutualistisilla eli molempia osapuolia hyödyttävillä (++) vuorovaikutuksilla, kommensalistisilla eli vain toista osapuolta hyödyttävällä (+0) vuorovaikutuksella, amensalistisella eli hyödyttömällä, mutta toista osapuolta haittaavalla vuorovaikutuksella (0-), tai patogeenisillä eli toista osapuolta hyödyttävällä ja toista haittaavalla vuorovaikutuksella (+-) (Kumar ym. 2016). Kasvi-mikrobi -vuorovaikutus voi olla lyhytaikainen tai pitkäaikainen ja varsin kiinteä, jolloin vuorovaikutusta voidaan sanoa symbioosiksi. Mikrobi määritellään kasvisymbiontiksi, kun se ei aiheuta havaittavia oireita ja se vaikuttaa myönteisesti kasvin kasvuun, abiottisen ja bioottisen stressin sietoon, sekä aineenvaihduntatuotteiden kertymiseen (Yang ym. 2013). Kasvi-mikrobi -vuorovaikutus voi olla myös hyvin löyhä, esimerkiksi ritsosfäärin mikrobien osalta voidaan puhua assosiatiivisista mikrobeista.

Kasvien ja mikrobien muodostama mutualistinen symbionttinen suhde tarkoittaa eliöiden välistä yhteiselämää, josta on molemmille osapuolille hyötyä resurssien kuten ravinteiden ja yhteytystuotteiden vaihdon kautta (Timonen ja Valkonen 2013). Kasveilla on sekä sieni- että bakteerisymbiontteja, minkä lisäksi kasvit muodostavat symbiooseja myös arkkien kanssa (Yang ym. 2013; Hardoim ym. 2015). Mykorritsasienet eli sienijuuret ovat yleisin mikrobien ja kasvien välinen symbioosi. Morfologian ja fysiologian perusteella mykorritsojen kaksi pääryhmää ovat ekto- ja endomykorritsat (Marschner 2011). Ektomykorritsat (ECM) eli

pintasienijuuret muodostavat rihmastorakenteita kasvien soluväleihin ja juurien pinnalle muodostaen useiden solukerrosten paksuisen vaipan juuren ympärille. Endomykorritsoilla eli sisäsienijuurilla sienirihmasto läpäisee juuren soluseinän ja sieni muodostaa rakenteita kasvin soluseinän ja solukalvon väliin (Timonen ja Valkonen 2013). Sisäsienijuurista yleisin ja parhaiten tunnettu on arbuskelimykorrhitsa (AM) eli keräsienijuuri. Nimi viittaa kerämäisiin rakenteisiin, joita sienijuuri kasvattaa kasvisolun seinien sisäpuolelle. (Marschner 2011; Timonen ja Valkonen 2013).

Kasvin kasvua edistäviä juuristobakteereita on löydetty ja tunnistettu niin ritsosfääristä, kuin juuren sisältä endosfääristä. Yksi parhaiten tunnetuista kasvien endofyyttisistä bakteerisymbionttiryhmistä on hernekasveilla juurinystyröitä muodostava ja tyypeä kasville käyttökelpoiseen muotoon muuttava *Rhizobia*, joka käsittää useita lajeja muun muassa suvuista *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* ja *Sinorhizobium* (Hayat ym. 2010; Hardoim ym. 2015). Kasveilla yleisesti tavattavista endofyyttisistä bakteereista valtaosa lukeutuu pääjaksoihin proteobakteerit (*Proteobacteria*), aktinobakteerit (*Actinobacteria*), firmikuutit (*Firmicutes*) ja Bacteroidetes (Reinhold-Hurek ja Hurek 2011).

1.3.1 Mikrobien merkitys

Mikrobeilla on merkittävä vaikutus kasvien kasvuun, aineenvaihduntatuotteiden kertymiseen ja resistanssiin abioottista stressiä ja patogeenejä vastaan (Yang ym. 2013). Mikrobeista juurisienet eli mykorritsat vaikuttavat kasvien menestymiseen erityisesti edistämällä ravinteiden ja veden ottoa laajentamalla sienirihmoillaan kasvin ravinteita ottavaa pinta-alaa, mutta myös suojaamalla juuristoa patogeeneilta mikrobeilta tai esimerkiksi raskasmetalleilta (Timonen ja Valkonen 2013; Van der Heijden 2001). Juurisienet kasvattavat rihmastoa maahan kasvin juurien ulkopuolelle ravinteiden ottoa varten. Keräsienet lisäävät kasveilla erityisesti fosforin, mutta myös sinkin ja kuparin, sekä typen ottoa maaperästä. Pintasienijuuret muodostavat kasvin juuren ympärille usean solukerroksen paksuisen vaipan ja kasvattavat rihmastoa juuren ympärillä olevaan maahan (Timonen ja Valkonen 2013). Pintasienijuurten merkittävin vaikutus metsäpuille on ravinteiden oton parantaminen erityisesti vähäisen liikkuvuuden alkuaineiden, kuten fosforin ja hivenaineiden (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, B, Mo ja Cl), sekä typen suhteen (Courty ym. 2010; Welch 1995). Kangasmetsissä havupuiden lyhytjuuret ovat käytännöllisesti katsoen kaikki pintasienijuuria, ja puiden ravinteiden otto tapahtuu siten lähes kokonaan sienten välityksellä (Timonen ja Valkonen 2013). Osalla mykorritsasienistä on itsessään endosymbionttisia bakteereita, esimerkiksi pintasienijuurten muodostama

ektomykorritsosfäärissä on laaja mikro-organismien yhteisö, jossa mikrobit vaikuttavat toistensa toimintaan (Rosenblueth ja Martínez-Romero 2006; Courty ym. 2010). Pintäsienijuuret ja bakteerit vaikuttavat yhdessä myös maaperän rapautumis- ja liukoistumisprosesseihin (Courty ym. 2010). Mykorritsakolonisaation tiedetään myös voivan parantaa kasvin kokonaisvastustuskykyä siten, että jopa kolonisoimattomat juuret tulevat resistenteiksi patogeeneille (Marschner 2011).

Endofyyttisiä bakteerilajeja on paljon ja ne voivat edistää kasvin kasvua muun muassa helpottamalla ravinteiden kuten typen ja fosforin ottoa maaperästä, edistämällä kasvin omaa hormonintuotantoa kasvihormonien syntetisoinnilla tai vähentämällä ja estämällä kasvitauteja esimerkiksi syntetisoimalla patogeenisten mikrobien toimintaa estäviä yhdisteitä (Rosenblueth ja Martínez-Romero 2006; Hayat ym. 2010; Terävä 2008). Saastuneella maaperällä endofyyttiset bakteerit voivat lisätä orgaanisten saasteiden hajoamista ja vähentää saasteiden fytotoksisuutta ja haihduntaa, sekä parantaa kasvin kasvua ja sopeutumista. (Afzal ym. 2014). Bakteereilla on myös merkittävä vaikutus kasvien raskasmetallien sietämiseen ja ottoon maaperästä (Rajkumar ym. 2012).

1.3.2 Mikrobiyhteisöjen muodostuminen ja yhteisörakenteeseen vaikuttavat tekijät

Kasvin juuriston mikrobiyhteisö muodostuu siementen mukana kulkeutuvien, maaperässä olevien ja sinne kulkeutuvien, sekä muiden kasvien juurien mikrobikolonisaatioiden pohjalta (Marschner 2011; Hardoim ym. 2008). Mykorritsasienillä juurten kolonisaatio saa alkunsa joko maaperässä olevista lisääntymisyksiköistä, joita ovat itiöt ja kolonisoitujen juurten jäännökset, tai naapurijuurista, jotka voivat olla joko omia tai muiden samaa tai eri lajia olevien kasvien juuria (Marschner 2011). Sisäsienijuurista keräsienet ovat riippuvaisia isäntäkasvistaan, joita ilman niitä löydetään maaperästä vain suvuttomina itiöinä (Timonen ja Valkonen 2013). Keräsienijuurilla maassa jo ennestään oleva vahingoittumaton rihmastoverkko onkin paras sienijuuren lähde itiöiden hitaan itämisen vuoksi (Vestberg ja Timonen 2018).

Kasvi voi omalta osaltaan säädellä ritsosfäärin mikrobivuorovaikutuksia juuresta vapauttamillaan eritteillä, joiden koostumukseen vaikuttaa esimerkiksi kasvin ravinnetilanne (C.-H. Yang ja Crowley 2000). Muita merkittäviä juuriston mikrobiyhteisön koostumukseen vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa maaperätyyppi ja maaperän kunto (pH, kosteus- ja ravinnetasapaino, maaperämikrobisto), biogeografia (leveysaste, lämpötila, sadanta, valon määrä), muu kasvillisuus, mikrobi- ja kasvi-mikrobivuorovaikutukset, kasvin laji- ja genotyyppi, sekä kasvin ikä ja juuriin kuljetettujen sokereiden määrä (Gaiero ym. 2013;

Karliński ym. 2010; Fernández-Calviño ja Bååth 2010; Pennanen ym. 1999; Vestberg ja Timonen 2018; Saravesi ym. 2015). Myös esimerkiksi patogeeniset mikrobit voivat muuttaa kasvin infektoitujen juurien ritsosfäärin bakteeriyhteisöjen koostumusta (Yang ym. 2001).

Herbivorian eli laidunnuksen aiheuttamat laajat vauriot kasvin maanpäällisissä osissa vähentävät hiilen eli sokeriyhdisteiden tuottamista ja jakautumista maan alle vaikuttaen siten juuriston mikrobistoon (Saravesi ym. 2015). Ympäristöistä heinä- ja ruohokasvillisuuden läheisyydessä itävän taimen juurille löytyy lähinnä vain keräsieniä, kun taas metsäympäristössä on enemmän myös pintasienijuuria (Vestberg ja Timonen 2018). Monet kasvilajit ja -suvut kykenevät muodostamaan sekä pinta- että keräsienijuuria ja usein kasvilla voi olla nuoruvaiheessa enemmän keräsienijuuria, jotka korvautuvat myöhemmin pintasienijuurilla (Vestberg ja Timonen 2018).

Maaperän ominaisuuksista erityisesti pääravinteiden kuten typen ja fosforin määrällä on suuri merkitys mikrobiyhteisöjen muodostumisessa. Esimerkiksi pintasienijuuret kykenevät mobilisoimaan orgaanisia ravinteita ja ovat pääosin vastuussa kasvin typen hankinnasta, minkä seurauksena typen lisääminen maaperään voi aiheuttaa pintasienijuurilajien vähenemistä (Saravesi ym. 2015). Typen lisäys voi vaikuttaa myös bakteerilajien runsaussuhteisiin muuttaen niitä ja siten myös maaperän ominaisuuksia, kuten esimerkiksi maaperän pH:ta ja hengitystä (Zhang ym. 2013; R. Wang ym. 2019). Bakteerien maaperään aiheuttamat muutokset puolestaan vaikuttavat muihin mikrobeihin. Häirityissä ympäristöissä, joissa esimerkiksi maaperän ravinne- tai kosteustasapaino on muuttunut ulkoisen tekijän vuoksi, havaitaan usein muutoksia maaperän ja kasvien juurten mikrobikolonisaatioissa. Sienillä yksi tällainen häirityissä ympäristöissä usein runsaampana tavattava ryhmä on esimerkiksi Pezizales-lahkon pintasienijuuria muodostavat kotelosienet (Gehring ym. 1998).

1.3.3 Mikrobiyhteisöjen tutkimus molekyyliomenetelmillä

Mikrobien tunnistuksessa käytetään nykyään usein molekyyliomenetelmiä, jotka perustuvat eliöiden DNA:han ja sen vaihtelevuuteen eri lajien ja lajiryhmien välillä (Mälkönen ja Derome 2003). Sienillä lajien tunnistukseen, fylogeniaan ja systematiikkaan hyödynnetään rDNA-alueella eli ribosomaalista RNA:ta (rRNA) koodaavalla geenialueella sijaitsevaa ITS (Internal Transcribed Spacer) aluetta, joka toimii geneettisenä merkinä sukulaisuussuhteiden ja lajien määrittämisessä (Schoch ym. 2012; Begerow ym. 2010). Arkeoneilla ja bakteereilla vastaava laji- ja sukulaisuussuhteiden selvitykseen käytetty ribosomaalinen merkkialue on 16S rDNA-alue (Woese ja Fox 1977).

DNA-merkkialueen monistaminen tapahtuu polymeerasiketjureaktiolla (PCR) ja se vaatii toimiakseen lyhyen yksijuosteisen DNA-pätkän eli alukkeen, joka sitoutuu monistettavaan DNA-juosteeseen tarjoten aloituspaikan uuden juosteen rakentamista katalysoivalle polymeerasientsyymille. Polymeerasi voi rakentaa juostetta vain yhteen suuntaan, joten monistettavan DNA:n molemmille juosteille tarvitaan omat alukkeensa (Alberts 2008). Näitä alukkeita kutsutaan etu- ja taka-alukkeiksi (Diamantina Institute 2018). Alukkeiden ja DNA-polymeerasin lisäksi DNA:n tai sen osien monistamisessa PCR:llä tarvitaan vapaita nukleotideja. Vapaat nukleotidit (dNTPs) toimivat uuden DNA-juosteen substraatteina ja koostuvat yhdestä emäsosasta (A, G, C, T), sokeriosasta ja trifosfaatista (TP). Nukleotidit lisätään PCR:ään dNTP mixinä, joka sisältää kaikkia tarvittavia nukleotideja (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) sopivassa suhteessa (Alberts 2008). PCR-synteesireaktio on kolmivaiheinen ja sitä toistetaan useaan kertaan samalle DNA-jaksolle. Synteesikierroksen ensimmäisessä vaiheessa DNA denaturoidaan yksijuosteiseksi kuumentamalla, 2. vaiheessa alukkeet liitetään yksijuosteiseen DNA:han ja 3. vaiheessa uuden DNA-juosteen synteesi yksijuosteiseen DNA:han alkaa alukkeiden kohdalta. Jokaisen synteesikierroksen aikana DNA:n määrä kaksinkertaistuu kasvaen synteesikierroksia toistettaessa eksponentiaalisesti (Aspi ym. 2015).

Monistettujen DNA-juosteiden emäsjärjestyksen eli sekvenssin selvittämisessä uuden sukupolven sekvensointitekniikat (NGS: next-generation sequencing) ovat aika- ja kustannustehokkaita verrattuna perinteiseen ja tarkkaan Sanger-sekvensointiin (Quail ym. 2012; Besser ym. 2018). Tässä työssä sekvensointi tehtiin Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) sekvensointilaitteella. Sekvensoinnissa PCR-tuotteiden erotteluun näytteittäin voidaan hyödyntää DNA-viivakoodausta. Eri näytteille liitetään PCR:ssä käytettyyn alukkeeseen oma lyhyt DNA-tunnisteviivakoodi (barcode) eli DNA-juoste, joka eroaa muiden näytteiden viivakoodista. Myöhemmin sekvenssoidut näytteet voidaan tunnistaa ja yhdistää sekvensseistä löydettyjen viivakoodien avulla oikeisiin näytteisiin (Hebert ym. 2003). Lisäksi Ion Torrent sekvensoinnissa alukkeissa on Ion Torrent -sekvensointilaitteelle ominaiset adapterit, jotka kiinnittyvät sekvensoinnissa käytettäviin ”helmiin” (Ion Sphere Particles), joiden pinnalla on adaptereille vastinparit. Nämä ”helmet” sijoittuvat jokainen omaan kaivoonsa Ion Torrent sirulla, jossa tapahtuvat emästen tunnistukseen vaadittavat reaktiot ja josta ne luetaan digitaaliseen muotoon (Quail ym. 2012).

1.4 Pajut ja niiden käyttö biopuhdistuksessa

Pajut (*Salix* L.) kuuluvat pajukasvien heimoon (Salicaceae). Ne ovat kaksikotisia puita, pensaita tai varpuja. Monet pajulajit voivat risteytyä keskenään ja risteymien kantalajien ominaisuuksien ilmeneminen risteymissä vaihtelee (Koistinen ym. 1998). Pajulajeja ja niiden risteymiä voidaan hyödyntää monimuotoisesti niin vesien ja maaperän puhdistukseen, kuin kasvibiomassan kasvatukseen energiantuotantoa varten. Pajunviljelyn historia ulottuu Suomessa jopa 250 vuoden taakse. Alkujaan pajua viljeltiin lähinnä koriteollisuutta varten, mutta sen suuret käyttökohteet ovat vuosikymmenien kuluessa vaihtuneet ensin sellukuidun ja myöhemmin energian tuotantoon. 1970-luvulla syntyi oma käsitteensä energiapaju. Merkittävimmät Suomessa käytetyt risteytyksen tuloksena syntyneet lajikkeet ovat peräisin Ruotsista, jossa jalostus on kaupallistunut 1990-luvulla. Suomessa pajulajikkeiden kehittäminen on tähän mennessä perustunut lähinnä luonnosta kerättyjen pajujen testaukseen ja valintaan (Pohjonen 2015).

Pajut (*Salix* spp.) ovat fytoimediaation kannalta kiinnostava ryhmä, sillä ne kasvavat nopeasti, sietävät suuria määriä vettä maaperässä, ja ovat monipuolinen ryhmä sisältäen yli 400 lajia, 200 hybridiä ja tuhansia lajikkeita. Lisäksi on osoitettu, että pajuilla on enemmän saasteita hajottavia bakteereita ritsosfäärissään verrattuna moniin muihin kasvilajeihin (Yergeau ym. 2018). Paju esimerkiksi puhdistaa vettä ja maaperää raskasmetalleista, kuten sinkkiä ja kadmiumia (Kuffner ym. 2008). Pajuviljelmien kasteleminen jätevedenpuhdistamoiden jo käsitellyillä prosessivesillä tuo veden sisältämät ravinteet hyötykäyttöön sen sijaan, että ne päätyisivät vesistöihin. Ravinteet edistävät tällöin energiapajujen kasvua ja pajujen keräämät raskasmetallit voidaan myöhemmin rikastaa tuhkaan biomassan poltolla (Niemi 2014). Esimerkiksi Ruotsissa pajuviljelmiä on jo käytetty onnistuneesti esikäsiteltyjen ravinnerikkaiden jätetuotteiden, kuten yhdyskuntajätevesien ja kaatopaikkojen suotovesien puhdistukseen saasteista ja ylimääräisistä ravinteista (Dimitriou ja Aronsson 2005). Maaperässä pajut muodostavat symbioosin sekä pintajuurisienten (ektomykorritsasienten) että keräsienten (arbuskelisienten) kanssa (Courty ym. 2010).

1.5 Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit

Tämän Pro gradu -työn mittaukset on tehty osana Oulun yliopiston koordinoimaa kolmivuotista HuJa-hanketta (1.10.2015-30.9.2018). HuJa-hanke on pääosin Euroopan aluekehitysrahaston (EAKR) Pohjois-Pohjanmaan elinkeino-, liikenne- ja ympäristökeskuksen kautta rahoittamaa selvitystyötä, jonka tarkoituksena on löytää keinoja pohjoisilla alueilla

sijaitsevien taajamien ”Metallipitoisten hulevesien ja käsiteltyjen jätevesien puhdistuksen tehokkuuden parantamiseen luonnonmateriaaleilla”. Hanke jakautui kolmeen osatavoitteeseen, joista yhden tarkoituksena oli selvittää Kuusamoon perustetun koekentän (pajukosteikon) avulla, kuinka paljon voitaisiin vähentää jo käsiteltyjen jätevesien ravinne- ja raskasmetallipitoisuuksia. Vastaavia selvityksiä ja kokeita on tehty aiemminkin, mutta eteläisemmissä olosuhteissa (Postila ym. 2018). Koska puhdistettavan veden ja ympäristön lämpötila vaikuttavat ravinteiden ja haitta-aineiden poistoon, niin käsittelyn tehokkuus voi olla kylmemmissä ilmastoissa kausittaista ilmastosta johtuen (Kadlec ja Reddy 2001). Lisäksi ilmasto-olosuhteet voivat vaikuttaa pajulajien selviytymiseen ja biomassan tuottoon. Hankkeen tarkoituksena olikin löytää erityisesti pohjoisen kylmempiin olosuhteisiin soveltuvia pajulajikkeita (Postila ym. 2018).

Pro Gradu -työssäni tutkin HuJa-hankkeen käsiteltyjen yhdyskuntajätevesien puhdistuskosteikoissa kasvaneiden pajujen juuriston mikrobiyhteisöjä, tarkoitukseni selvittää 1) ovatko eri pajulajikkeiden juuristojen yhteisöt erilaisia koostumukseltaan ja 2) eroavatko puhtaalla vertailualueella kasvaneiden yksilöiden mikrobistot jätevedenpuhdistuskosteikossa kasvaneiden ja jäteveden mukana lisävetä, sekä -ravinnetta saaneiden pajuyksilöiden mikrobistoista? Lisäksi selvitän, 3) poikkeavatko kokeessa hyvin ja heikosti selvinneiden pajujen eli korkean ja alhaisen biomassan pajujen mikrobistot merkittävästi toisistaan?

Tutkimuksen pajulajikkeilla Gudrun, Karin ja Klara on aiemmissa kasvatuskokeissa todettu erilaista kasvu- ja talvensietopotentiaalia (Pohjonen 2015). Eri lajikkeiden juurten mikrobistojen oletetaan poikkeavan toisistaan. Lisäksi Torangin maatiainen (todennäköisesti *Salix phylicifolia*) on kasvatuskokeissa täysin uusi laji ja samalla paikallinen kanta tutkimusalueelta. Paikalliset kasvit ovat sopeutuneet muodostamaan tarvitsemansa vuorovaikutussuhteet maaperän mikrobiston kanssa. Ns. vierasperäisillä lajeilla voi uudenlaisessa mikrobiympäristössä uupua sellaisia maaperästä löytyviä mikrobeja, joiden kanssa ne normaalisti muodostavat kasvua ja selviytymistä tukevia vuorovaikutussuhteita (Inderjit ja van der Putten 2010). Todennäköisesti myös hyvin kasvaneiden eli paljon biomassaa tuottaneiden pajuyksilöiden mikrobistoissa voisi olla havaittavissa enemmän kasvua tukevia mikrobeja, kuin huonommin kasvaneilla eli vähän biomassaa tuottaneilla pajuyksilöillä. Koealueella pajut kasvavat ravinteiden ja kosteuden suhteen häiriityssä ympäristössä. Tällaisissa ympäristötekijöiltään häiriityissä ympäristöissä on havaittu ja tunnistettu mikrobiryhmiä, jotka esiintyvät suhteellisesti runsaampina, kuin ei häiriityissä ympäristöissä (Gehring ym. 1998).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkitut pajulajikkeet

Koealueelle istutettiin kesäkuun alkupuolella 2016 yhteensä 1656 pajupistokasta. Istutetuista pistokkaista tarkastelen tässä työssä kolmea biomassantuottoon viljeltyä pajulajiketta, jotka ovat Gudrun (396 kpl), Karin (396 kpl) ja Klara (396 kpl), sekä tutkimusalueelta Kuusamon Torangista pistokkaina kerättyä pajua, joka nimettiin Torangin maataiseksi (432 kpl). Lajike on todennäköisesti paikallinen kanta kiiltopajusta *Salix phylicifolia* (Postila ym. 2018). Yhteensä tutkimuksen pistokkaita oli koealueella 1620 kappaletta, joista otimme tarkasteluun tässä työssä 30 kappaletta.

Lajike *Salix gmelinii* Gudrun on ruotsalaisen pajunjalostuksen tuotosta vuodelta 1995. Lajikkeen äiti (emikasvi) on venäläinen *Salix gmelinii* Helga ja isäklooni on löytynyt Lounais-Ruotsista, mutta sen alkuperä on jäänyt epäselväksi. Gudrunilla oli Ruotsin puolella kehittynyt ruosteongelmaa, jota ei kuitenkaan ehditty havaittu Suomessa. Sen pituuskasvu ja tuottavuus eivät ole olleet kasvatuskokeiden parhaimmistoa, mutta lajike on ollut kuitenkin yksi parhaita talvehtijoita useimmissa suoritetuissa kasvatuskokeissa. Ruosteongelma on edeltävien vuosien tutkimuksissa ollut suurempi ongelma vain laajoilla yhden tai muutaman lajikkeen alueilla ja tämän vuoksi se nähdään ruosteherkkyydestään huolimatta mahdollisena lajikkeena pohjoisiin olosuhteisiin muiden lajikkeiden rinnalle (Pohjonen 2015).

Karin on 1990-luvun lopulla Ruotsissa risteytetty lajike. Se sai 2000-luvun alussa mainetta hyvällä talven- ja ruosteenkestävyydellään. Karin-lajikkeelta löytyy sukutaulussa samat venäläiset talvenkestävyyttä parantavat kantalajit kuin Klaralla, mutta eri vanhempien puolelta. Karinin isä on venäläinen *Salix viminalis* Ivar ja äiti hybridipaju, jonka yksi kantalajeista on siperianpaju *Salix schwerinii* Amgunkaja. Karin-lajike on menestynyt hyvin Piispannevan, Alavieskan ja Sotkamon kokeissa, kuten myöhemmin risteytetty Klarakin. Ruotsissa sekä etelämpänä Euroopassa Karinilla on havaittu suhteellisesti heikompa tuottavuutta, jonka vuoksi se on vedetty markkinoilta ja jäänyt vähäisemmälle suosiolle. Kuitenkin näiden kahden lajikkeen kehittäminen on ollut erittäin merkityksellistä biomassapajun viljelyn mahdollistamiselle Salpausselän pohjoispuolille, Sisä-Suomeen, sekä pienilmastoltaan karujen turvesoiden pohjille (Pohjonen 2015).

Klara on vuonna 2008 myyntiin tullut lajike. Se nousi nopeasti tunnettujen tuottavimpien, sekä talven- ja ruosteenkestävimpien pajulajikkeiden joukkoon. Suomen olosuhteissa Klara on menestynyt hyvin Haapaveden korkeudella Piispannevalle ja Alavieskassa Jukaturpeen suorittamassa kasvatuskokeessa. Inkoossa pajukkopuhdistamon kasvatuksessa lajikkeelle on

mitattu jopa 460 cm kasvu vuoden 2013 aikana. Sukutaulussa Klaralla löytyy äidin puolelta talvenkestävyyttä lisäävä venäläinen *Salix viminalis* Ivar ja isän puolelta ruosteenkestävyyttä parantava *Salix schwerinii* Amungskaja. Amungskaja on yksi tärkeimmistä biomassapajun jalostuksen kantalajikkeista hyvän ruosteenkestävyytensä vuoksi, sillä usein lajikkeiden laaja-alaisessa viljelyssä on törmätty tuhoisasti leviävään ruosteongelmaan (Pohjonen 2015).

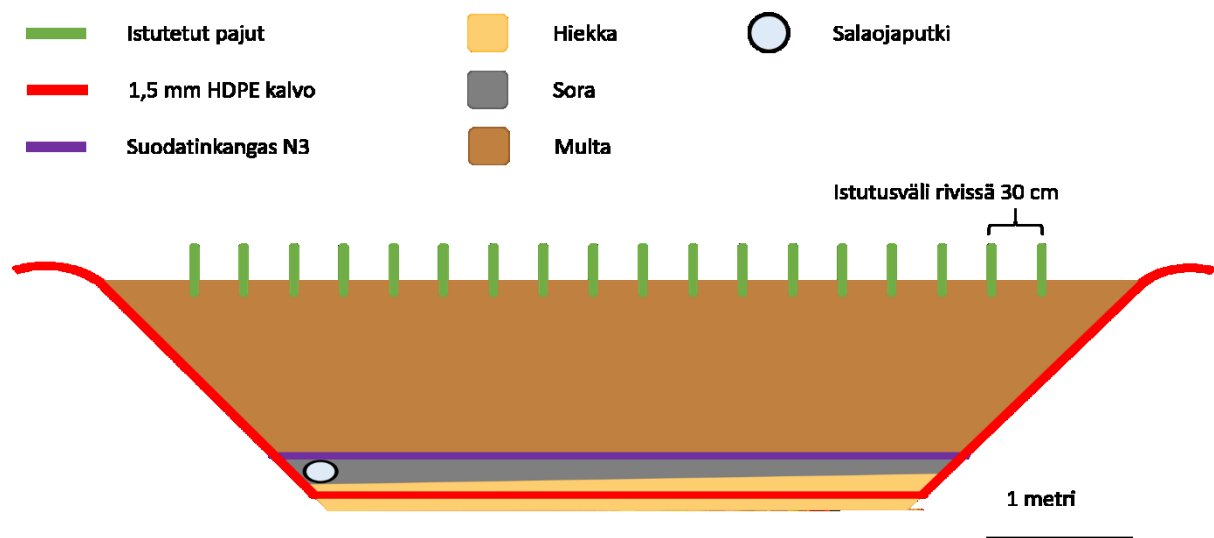
Pajulajikkeiden Gudrun, Karin ja Klara pistokkaat ovat peräisin Alavieskasta Sulo Hannulan pajuviljelmiltä, josta ne leikattiin kevättalvella 2016 ja säilöttiin jääkaapeissa (-2 °C). Istutetut pistokkaat olivat 18-20 cm pitkiä ja halkaisijaltaan vähintään 1 cm. Tutkimusalueen Torangin maatiainen -lajikkeen pistokkaat leikattiin kevättalvella 2016 ja ne säilöttiin lumipenkassa kevään ajan. Nämä pistokkaat olivat muutaman millin vahvuisia ja noin 20-30 cm pitkiä. Ennen istutusta kaikkia pistokkaita liotettiin vedessä vähintään vuorokauden ajan (Postila ym. 2018).

Pajujen ensimmäisen kasvukesän (2016) jälkeen selviytymisprosentti koealueella pajulajikkeittain oli seuraava: Gudrun 96 %, Klara 86 %, Karin 75 % ja Torangin maatiainen 44 %. Toisen, eli tutkituille pajuille viimeisen kasvukesän (2017) jälkeen selviytymisprosentti oli seuraava: Gudrun 96 %, Klara 76 %, Karin 63 % ja Torangin maatiainen 14 %. Kontrollialueella pajujen selviytymistä tarkasteltiin kahden kesän jälkeen (2017), jolloin pajujen hengissä selviämisen tilanne oli seuraava: Gudrun 90 %, Klara 60 %, Karin 10 % ja Torangin maatiainen max 20 % (ei pystytty arvioimaan varmasti, että ovat juuri istutetut yksilöt). Selviytyneistä pajuista valittujen näyteyksilöiden laboratoriossa punnitut versojen (varsi + lehdet) kuivabiomassat vaihtelivat välillä 0,33 g – 825,02 g. Varsien osuus kokonaisbiomassasta oli lajikkeella Gudrun 75 %, Klaralla ja Karinilla 78 % ja Torangin maatiaisella 88 %. Kuivabiomassojen ja pajujen pituuden, sekä varren ympärysmittan avulla pajulajikkeille arvioidut kokonaisbiomassan (varsi + lehdet) tuotot hehtaaria kohden olivat koealueella Gudrun 5,7 t/ha, Klara 3,0 t/ha, Karin 1,7 t/ha ja Torangin maatiainen 0,02 t/ha ja kontrollialueella Gudrun 0,4 t/ha ja Klara 0,1 t/ha (Postila ym. 2018).

2.2 Tutkimusalue

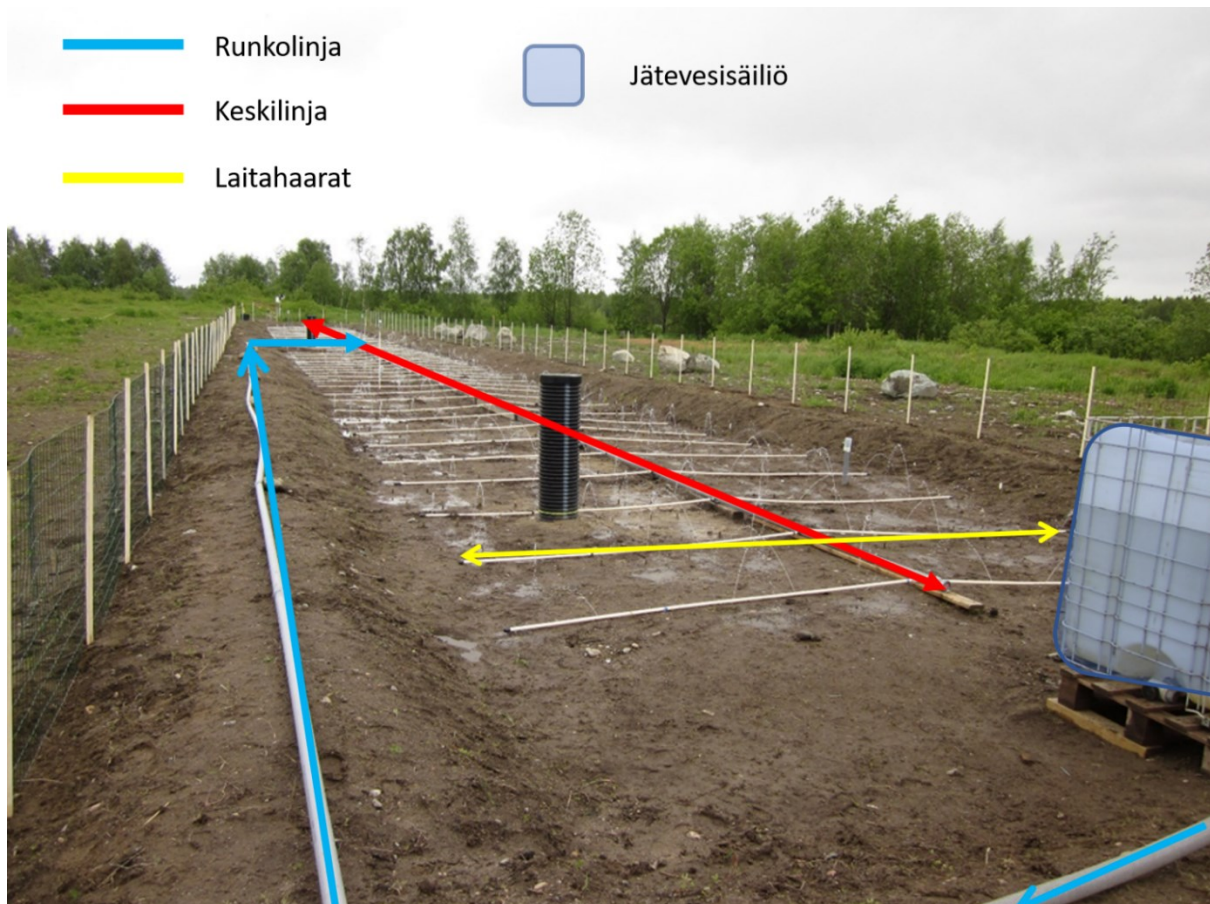
Loka-marraskuussa 2015 tutkimusta varten perustettu puhdistuskosteikko sijaitsee Kuusamon Torangissa jätevedenpuhdistamon vieressä. Paikka sijaitsee hieman pohjoisen napapiirin (66°32'N) alapuolella, 65°57' pohjoista leveyttä ja 29°10' itäistä pituutta (Maanmittauslaitos 2019). Koealueena toimii noin 350 m² kokoinen aidattu pajukosteikko ja sen viereen perustettu pienempi kontrollialue (Postila ym. 2018).

Koealue eli varsinainen pajukosteikko on eristetty maaperästä vettä läpäisemättömällä 1,5 mm paksuisella HDPE-kalvolla (High Density Polyethylene), jotta voidaan seurata kosteikolle johdettavan jätevedenpuhdistamolla jo käsitellyn jäteveden ravinneaine- ja raskasmetallipitoisuuksien muutoksia (kalvo kuvassa 1 punaisella). Kalvon päällä on hiekkakerros sekä salaojasora, johon asennettua salaojaputkea pitkin vedet kerätään kosteikolta mittakaivoon (kuvassa 1 keltaisella ja harmaalla). Kosteikolle on asennettu lisäksi putket, jotta kosteikon pohjan veden korkeutta voidaan seurata. Kosteikon täyttöön on käytetty paikalla ollutta maamateriaalia, josta on eroteltu isoimmat kivet pois (Postila ym. 2018).



Kuva 1. Pajukosteikon poikkileikkaus. Pajujen istutusväli rivissä on 30 cm. Multana on käytetty paikalla ollutta maa-ainesta. Kuvan mukaisesti laitimmaisilla pajuyksilöillä on laidassa hieman matalammin kasvutilaa juurakolle. Yksityiskohtaisemmat tiedot koealueen salaojasysteemistä ja muista teknisistä ratkaisuista löytyvät Huja-projektin loppuraportista (Postila ym. 2018).

Jäteveden jako on pyritty hoitamaan mahdollisimman tasaisesti koko kosteikon pinnalle (kuva 2). Jätevesisäiliöstä (tilavuus 1000 l; kuvassa 2 harmaansinisellä) pumpattiin putkistoa pitkin vettä kosteikolle kolmen minuutin aikana noin 930 litraa neljä kertaa päivässä kesällä 2016 ja kuusi kertaa päivässä kesällä 2017 (Postila ym. 2018).



Kuva 2. Jäteveden jakoputkistot pajukosteikolla. Vesisäiliöstä (harmaansinisellä) lähtevä runkolinja (sinisellä) kulkee laitapenkereen päällä kohti kosteikon keskiosaa. Keskilinja (punaisella) kuljettaa veden kosteikon molempiin päihin ja vesi purkautuu laitahaarojen (keltaisella) rei'istä kosteikon pinnalle. Veden jakautumisen tasoittamiseksi laitaputkissa on eniten reikiä runkolinjan ja keskilinan yhtymäkohtaan nähden kauimmaisissa laitaputkissa. Nuolet osoittavat veden kulkusuunnan. Musta putki keskellä on salaojaputken tarkastuskaivo. Pajukosteikon pituus on noin 64 m ja leveys noin 5 m. Kosteikkoa kiertävä aita antaa suojaa eläimiltä. Kuva on otettu kesäkuun 2016 alussa kosteikon perustamisen aikaan. Kuva: Heini Postila

Pajupistokkaat istutettiin putkiston ”laitahaarojen” ympärille 70 cm rivivälillä. Jokaiselle riville istutettiin yhteensä 18 pistokasta 30 cm etäisyydelle toisistaan. Lajikkeet istutettiin omiin riveihinsä siten, että vesisäiliöstä poispäin ensimmäiset kaksi riviä ensimmäisen laitahaaran ympärillä ovat ”Torangin maatiaista”, seuraavat kaksi riviä ovat Klaraa (2. laitahaara), sitten Gudrunia (3. laitahaara), Karinia (4. laitahaara) ja seuraavista riveistä eteenpäin samalla tavalla ”Torangin maatiaisesta” jatkuen (kuva 3). Poikkeuksena 9. laitahaaran riveihin istutettiin tämän tutkimuksen ulkopuolelle jätettyjä eri lajikkeita olevia pottitaimia. Pajupistokkaiden juurtumista ja kasvuun lähtöä tuettiin poistamalla muuta alueelle leviävää kasvillisuutta ensimmäisen kesän (2016) aikana säännöllisesti ja seuraavana kesänä (2017) muutaman kerran kevyemmin (Postila ym. 2018).

Lisäksi pajukosteikon ulkopuolelle 5 m etäisyydelle perustettiin pienempi kontrollialue. Kontrollialueelle ei johdettu ylimääräisiä ravinteita ja kosteutta jäteveden tai muun muodossa, eikä sitä eristetty maaperästä. Tämän vuoksi kosteikon saama vesimäärä oli erityisesti kasvukauden alussa kesäkuussa huomattavasti suurempi, kuin kontrollialueen pelkästään sadantana saama vesimäärä (Kuva 2.7. a, Postila ym. 2018). Kontrollialueelle istutettiin noin 10 kappaletta jokaista pajulajiketta (Gudrun, Klara, Karin ja Torangin maatiainen) samalla 30 cm pistokas- ja 70 cm rivivälillä, kuin koealueella. Kontrollialueen maaperä on samankaltaista koealueen maaperän kanssa. Kontrollialueella ei suoritettu rikkakasvien poistotoimenpiteitä (Postila ym. 2018).

Puhdistuskosteikko poisti hyvin jäteveden mukana tullutta typpeä (kok. N, puhdistustehokkuus 2016: 86 % ja 2017: 78 %; lähtevän veden pitoisuus suhteessa tulevan veden pitoisuuteen), liukoisesta tyypestä pidättyi myös valtaosa: ammoniumtyppeä ($\text{NH}_4\text{-N}$, 2016: 78 % ja 2017: 95 %) ja nitriitti-nitraatti-tyypeä ($\text{NO}_{2+3}\text{-N}$, 2016: 87 % ja 2017: 18 %). Samoin fosforia poistui runsaasti (kok. P, 2016: 58 % ja 2017: 87 %) ja fosfaattifosforia ($\text{PO}_4\text{-P}$, 2016: 68 % ja 2017: 77 %). Kasvukausien 2016 ja 2017 aikana fosforia oli varastoitunut pajujen biomassaan 0,6 kg, mikä oli enemmän kuin kuormitus jätevedestä (0,22 kg). Postilan ym. (2018) mukaan pajut olivat todennäköisesti ottaneet lisää fosforia kasvuunsa maaperästä. Typeä oli varastoitunut pajujen biomassaan 5,5 kg eli paljon vähemmän, kuin mitä jäteveden mukana tuli (38 kg) ja muiden tekijöiden, kuten typeä takaisin ilmakehään vapauttavan nitrifikaatio-denitrifikaatioprosessin, arveltiin vaikuttaneen typen puhdistustehokkuuteen (Postila ym. 2018).

Puhdistuskosteikko oli pidättänyt kesän 2017 aikana myös esimerkiksi alumiinia (99 % tulevan veden pitoisuudesta), sinkkiä (77 %), lyijyä (47 %) ja tinaa (lähtevä pitoisuus oli alle määrittäysrajan) pajuihin ja/tai maaperään ja kosteikolta oli huuhtoutunut mm. mangaania (-1325 %) ja rautaa (-207 %). Koska huuhtoutumisprosentti on yli 100 %, aineita on huuhtoutunut myös maaperästä veden mukaan. Lisäksi maaperän (5-15 cm syvyydestä) alkuaine- ja ravinnepitoisuuksia mitattiin kesän 2016 alussa ennen puhdistuskosteikon käyttöönottoa ja kesän 2017 lopussa, mutta näissä arvoissa ei ollut tapahtunut merkittäviä muutoksia vuosien välillä (Postila ym. 2018).

2.3 Pajunäytteiden valinta ja juurten esikäsittely

Yhteensä 30 pajunäytettä kerättiin koe- ja kontrollialueelta syyskuun lopulla 28-29.9.2017, jolloin pajuyksilöt olivat kasvaneet kaksi kasvukautta kosteikolla (kuva 4). Jokaista lajiketta

valittiin koealueelta viisi yksilöä eli yhteensä 20 kappaletta. Valintaperusteina käytettiin pajujen kokoa ja sijaintia siten, että lajikkeista valittiin kookkaita eli hyvin kasvaneita ja pienempiä eli huonommin kasvaneita, sekä keskivertoisia näytteitä, kuitenkin ottamatta yksilöitä vierekkäisiltä kasvupaikoilta, vaan ympäri kosteikkoa (kuva 3). Kontrollinäytteitä otettiin selvitykseen mukaan yhteensä 10 kappaletta sen mukaan, miten eri lajikkeet olivat selviytyneet. Yhteensä kontrollinäytteitä saatiin/otettiin yksi Karin, viisi Gudrunia, kolme Klaraa ja yksi pienen kokonsa vuoksi epävarma Torangin maatiainen (Postila ym. 2018).



Kuva 4. Pajukosteikko syyskuun 2017 lopulla, jolloin näytteet kerättiin ja pajujen kuivabiomassat punnittiin. Pajujen lisäksi myös rikkaruohot ovat menestyneet alueella hyvin. Kuva: Heini Postila

Syksyllä 2017 pajunäytteiden (30 kpl) versot leikattiin 1 cm maanpinnan yläpuolelta ja varret ja lehdet kuivattiin laboratoriossa 105 °C. Kuivatuista näytteistä punnittiin kuivabiomassa (g). Versojen juuret kaivettiin multineen maaperästä noin kolmen litran vetoisiin muoviruukkuihin ja näytteet varastoitettiin pakastettuna noin -20 °C kevääseen 2018 asti.

Kaikki juurinäytteet sulatettiin liottamalla niitä reilu puoli tuntia vedessä. Ylimääräinen multa ja juuret poistettiin pajujuurakon ympäriltä mekaanisesti irrotellen sekä vedellä huuhdellen. Eri puolilta juurakko leikeltiin noin 500 mg mahdollisimman hienoa juurta, maksimissaan noin 1 mm läpimitaltaan. Juuret eroteltiin preparointimikroskoopin alla ja puhdistettiin huuhtomalla hanavedessä petrimaljalla, jonka jälkeen ne pakastettiin minigrip-pusseissa (-20 °C). Erottelussa käytetyt välineet pestiin ja desinfioitiin joka näytteen välissä 70% etanoliliuoksella, jotta edellisten näytteiden juuristomikrobit eivät pääse sekoittumaan seuraavaksi käsiteltäviin näytteisiin.

2.4 Juurten mikrobiyhteisön DNA:n eristys, monistus ja sekvensointi

DNA-eristystä varten juuria laitettiin 2 ml putkiin noin puolet putken tilavuudesta, jonka jälkeen niitä kylmäkuivattiin kaksi vuorokautta. Kylmäkuivauksen jälkeen putkiin lisättiin metallikuulat (2 kpl, Ø 5 mm), ja näytteet homogenisoitiin hienontamalla nestetypellä jäädytettynä TissueLyzer-laitteella (Qiagen). Homogenisoidut juurinäytteet pakastettiin (-20 °C) ennen DNA-eristystä.

DNA-eristys suoritettiin MoBio PowerSoil® DNA Isolation Kitillä (Qiagen) muuten valmistajan ohjeiden mukaisesti, mutta kylmäkuivattua ja hienonnettua juurimateriaalia punnittiin näytteeksi 0,02-0,05g, näytteet inkuboitiin 70 °C lämpötilassa 10 min C1-liuoksen lisäämisen jälkeen solujen hajoamisen helpottamiseksi ja lopullinen DNA liuotettiin 50 µl C6-puskuria 100 µl sijasta DNA:n väkevöimiseksi. Lisäksi osaan runsaimmin juurta sisältävistä näytteistä lisättiin ennen vorteksointia PowerBead-liuosta puolet lisää (375 µl) alkuperäisestä määrästä (750 µl) ja tämä huomioitiin eristuksen seuraavassa vaiheessa lisäämällä 90 µl solujen hajoamista edistävää C1 liuosta 60 µl sijasta. Eristyksen lopuksi DNA:n konsentraatio eli pitoisuus mitattiin NanoDrop 1000 -laitteella (Thermo Fisher Scientific) ja DNA pakastettiin (-20 °C) odottamaan monistamista polymeerasiketjureaktiolla (PCR).

PCR:ssä sieni- ja bakteerispesifisillä alukkeilla monistettiin näytteistä sienien ITS2 ja bakteereiden 16S rDNA aluetta. Monistusta varten kaikkien näytteiden DNA laimennettiin 5 ng/µl pitoisuuteen. Sienien ja bakteerien rDNA alueet monistettiin erikseen jokaiselle näytteelle 3 kertaa 15µl kokonaisreaktiotilavuudessa.

Sienillä PCR-reaktiossa (Liite: reaktioliuoksen koostumus Taul. L1) käytetty ohjelma oli: (1) 98 °C 1 min, (2) 30 toistoa: 98 °C 10 s, 57 °C 20 s ja 72 °C 30 s, (3) 72 °C 7 min ja (4) loppujäähdytys 4 °C. Sienien ITS2 rDNA alueen monistukseen käytettiin etualuketta fITS7 (3'-GTGARTCATCGAATCTTTG-5') (Ihrmark ym. 2012) ja taka-aluketta ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White ym. 1990). Bakteerien PCR-reaktion (Liite: reaktioliuoksen koostumus Taul. L2) ohjelma oli: (1) 98 °C 3 minuuttia, (2) 30 toistoa: 98 °C 10 s, 63 °C 30 s ja 72 °C 20 s, (3) 72 °C 7 min ja (4) loppujäähdytys 4 °C. Bakteerien 16S rDNA alueen monistukseen käytettiin etualuketta 519F (5'-ACAGCMGCCGCGGTAATWC-3') (Torrentó ym. 2011) ja taka-aluketta 926R (3'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-5') (Quince ym. 2011). Lisäksi sekä sienien, että bakteerien molemmissa alukkeissa oli Ion Torrent -sekvenssoinnin vaatimat adapterit, sekä sienien taka-alukkeessa (ITS4) ja bakteerien etualukkeessa (519F) erikseen jokaisella näytteellä yksilöllinen viivakoodisekvenssi.

Lopuksi PCR-tuotteet puhdistettiin sekvensointia häiritsevistä, reaktiossa ylijääneistä alukkeista ja nukleotideista, sekä väärän pituisista PCR-tuotteista magneettihelmiin perustuvalla AMPure XP reagenssilla (Beckman Coulter). Puhdistettujen näytteiden konsentraatio mitattiin Agilent 2100 Bioanalyzer laitteella (Agilent Technologies). Näytteet poolattiin eli yhdenmukaistettiin sekvensointia varten ekvivalenttisiin määriin. Käytännössä tämä tarkoittaa, että jokaista näytettä laitettiin sama määrä (ng) sekvensointiin. Sekvensointi eli näytteiden DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen tehtiin Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) -sekvensointilaitteella Oulun yliopiston Biocenterissä.

2.5 Bioinformatiikka

QIIME2-ohjelmistoa käytettiin mikrobien sekvenssidatan esikäsittelyyn ja taksonomian määrittämiseen UNITE ja SILVA -tietokantojen avulla (Bolyen ym. 2018; Nilsson ym. 2019; Quast ym. 2013). Tämän lisäksi QIIME2-ohjelmistolla tehtiin mikrobidatalle ANCOM, Gneiss ja PICRUST2 -analyysit (Mandal ym. 2015; Morton ym. 2017; Douglas ym. 2019)

Ion Torrentista saadut sekvenssit (6 289 706) prosessoitiin ja analysoitiin QIIME2 -ohjelmistolla (versiot 2019.1 ja 2019.4) (Bolyen ym. 2018) käyttäen CSC - tieteen tietotekniikan keskuksen tarjoamia laskentapalveluja (Supercluster Taito). Sienten ja bakteerien taksonomian määrittämiseen käytettiin UNITE ja SILVA -tietokantoja, joista sienille ladattiin UNITE-tietokannan uusimman version 8.0 dynamic-tiedosto (sh qiime release s 02.02.2019) ja bakteereille SILVA-tietokannasta versio 132 16S 99-tiedosto (silva release 132 10.04.2018).

Aluksi aineistosta poistettiin Cutadapt-ohjelmalla (Martin 2011) alamittaiset, alle sadan emäsparin mittaiset epäinformatiiviset sekvenssit, joita oli 7,2 % aineistosta. Poistamisen jälkeen sekvenssien kokonaislukumäärä oli 5 834 215 ja tästä eteenpäin bakteeri- ja sieniaineistot analysoitiin erikseen. Eri näytteistä peräisin olevat bakteeri- ja sienisekvenssit eroteltiin toisistaan DNA-viivakoodauksen avulla (demultiplexing) (Liite: viivakoodierottelu Taul. L3). Näytekohtaisesti erotellut sekvenssit siistittiin poistamalla PCR-alukkeet (bakteerit: 16S rDNA (519F, 926R); sienet ITS2 (ITS4, fITS7)) ja niiden ulkopuolelle jäävä sekvenssiosuus.

Siistittyjen sekvenssien laatu tarkistettiin ja korjattiin, kimeeriset (chimeric) eli yhdistyneet sekvenssit poistettiin ja bakteerisekvenssit lisäksi trimmattiin 220 emäsparin pituuteen DADA2-ohjelmistopakettin avulla (Liite: DADA2 Taul. L3). Callahan ym. (Callahan ym. 2017) suosittelevat DADA2-ohjelmistoa käytettäväksi sen tarkkuuden vuoksi perinteisten

OTU-klusterien (Operational Taxonomic Unit) muodostamisen sijasta. Tämän jälkeen sienisekvensseistä poistettiin alle 100 emäsparin sekvenssit (Liite: alle 100 emäsparia poisto Taul. L3). Neljän näytteen (GR17, KIR5, Ka4 ja KL6) sienisekvenssien määrä jäi alle 1000 sekvenssiä, joten ne poistettiin sieniaineistosta.

Bakteerien taksonomia-analyysyjä varten poimittiin trimmaamalla SILVA-viitetietokannasta alukkeiden avulla viitesekvenssit. Taksonominen Naive Bayes -luokittelija (Bokulich ym. 2018) harjoitettiin bakteereille QIIME2:ssa käyttäen trimmattuja viitesekvenssejä ja -taksonomiaa. Näytteiden sekvenssit luokiteltiin harjoitetun Naive Bayes -luokittelijan avulla taksonomisiin ryhmiin. Sienillä Naive Bayes -luokittelijan harjoittaminen UNITE-viitetietokannalla ei hyödy sekvenssien trimmaamisesta alukkeilla (QIIME 2 development team 2019), joten sienillä luokittelijan harjoittamiseen käytettiin UNITE-viitetietokannan alkuperäisen pituisia viitesekvenssejä.

Taksonomian määrittämisen jälkeen bakteeridatasta poistettiin kloroplastien ja mitokondrioiden DNA:sta peräisin olevat sekvenssit (Liite: kloro-/mitoDNA poisto Taul. L3). Näytteissä kloroplastien DNA:ta oli 19,4-65,7 % ja mitokondrioiden DNA:ta 2,1-18,3 % per näyte datasta. Sieniaineistosta poistettiin kaikki tunnistamattomat sienisekvenssit. QIIME2-esikäsitteilyiden jälkeen analysoitavien bakteerien sekvenssien kokonaismäärä oli 527 717 sekvenssiä ja sienillä 211 877 sekvenssiä (Liite: kloro-/mitoDNA poisto; alle 100 emäsparia poisto Taul. L3).

Bakteeri- ja sienidatalle tehtiin ANCOM analyysi (Analysis of Composition of Microbiomes) (Mandal ym. 2015). ANCOM on tilastollinen runsausanalyysi, joka huomioi mikrobistojen vertailussa tietojen taustalla olevaa rakennetta. Sitä voidaan käyttää mikrobiyhteisön koostumuksen vertailuun kahdessa tai useammassa eri populaatiossa. Analyysi havaitsee erot mikrobitalaksonien keskimääräisissä runsauksissa eri populaatioissa eli näytteissä (Mandal ym. 2015). Analyysin piirtämässä volcano-kaaviossa x-akselin clr -arvo (centered log-ratio) kuvaa taksonien vaikutuskokoeroa näytteiden välillä ja y-akselin W -arvo kuvaa tarkastellun mikrobitalaksonin hylättyjen alahypoteesien määrää eli kertoo kuinka monen muun mikrobitalakson kanssa suhteellisten osuuksien logaritmiset muutokset eroavat merkittävästi toisistaan eri näytteiden välillä (Quinn ym. 2018; Morton 2017b; 2017a). Koska logaritmia ei voida laskea nollalle, analyysissä on käytetty näennäislukuja (pseudocounts) ongelman ratkaisemiseen eli lisätty arvo 1 kaikkiin aineiston lukumääriin (Kumar ym. 2018; Morton 2016). Tämän vuoksi esimerkiksi liitteissä esitettyjen prosenttipiste-tilkoiden (Liitteet: Taul. L11 ja L17) 1-arvot ovat todellisuudessa 0-arvoja.

Sekä bakteereille, että sienille tehty Gneiss-analyysi (Balance Trees) (Morton ym. 2017) pyrkii välttämään pelkillä mikrobien suhteellisilla osuuksilla tehtäviin mikrobiston koostumuksen mittauksiin liittyvät yksittäisten lajien todellisen kasvun ja laskun tarkastelun ongelmat, jotka pohjautuvat siihen, että muutokset yhden taksonin suhteellisissa runsauksissa vaikuttavat selvästi muiden taksonien suhteellisiin runsauksiin. Sen sijaan, että tehtäisiin päätelmiä muutoksista yksittäisissä lajeissa, Gneissin avulla voidaan tarkastella muutoksia mikrobien alayhteisöjen välisessä tasapainossa, jotta ymmärrettäisiin mikrobiyhteisöjen ekologisten lokeroiden eroavuudet (Morton ym. 2017). Analyysiä varten rakennettu puu määrittää, mitkä tasapainot arvioidaan eli minkä lajien osayhteisöjä verrataan. Ulkoisesti määritelty puu rakennetaan pohjautuen hypoteesiin liittyvään numeeriseen/metriseen arvoon, kuten pH (vertaa esim. fylogeniaan perustuva puu) (Birgmingham 2018).

Lisäksi bakteereille tehtiin PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) -analyysi (Douglas ym. 2019). PICRUST2 on ohjelmistopaketti, joka ennustaa mikrobiyhteisön geneettistä toiminnallista potentiaalia etsimällä, mitä biosynteesireittejä mikrobiyhteisöstä voisi löytyä merkkigeenisekvenssien perusteella. PICRUST2:iin syötetään merkkigeenisekvenssit (tässä tapauksessa pätkä sekvensoitua 16S rDNA-aluetta) ja niiden runsaudet. Ohjelmiston algoritmi yhdistää näytteiden merkkigeenisekvenssit tietokannan viitesekvensseihin, sijoittaen samalla sekvenssit jo olemassa olevaan viitesekvensseistä rakennettuun fylogeneettiseen geeniperhe-puuhun. Ohjelmisto laskee, kuinka paljon merkkigeenisekvenssejä yhdistyy fylogeneettisen puun geeniperheisiin. Geeniperheillä on yhteys biosynteesireitteihin, jolloin geeniperheeseen yhdistyneiden merkkigeenisekvenssien määrän perusteella lasketaan biosynteesireittien määrät. PICRUST2 antaa tulosteena ennustetut näytekohtaiset mikrobiyhteisön biosynteesireitit ja niiden runsaudet (Douglas ym. 2019). Mikrobiyhteisössä yleisenä havaittavien biosynteesireittien pohjalta voidaan tehdä päätelmiä siitä, minkälaisia toiminnallisia funktioita mikrobiyhteisöllä voisi olla esimerkiksi ravinteiden tai raskasmetallien hajottamisessa ja muuttamisessa toiseen muotoon.

Lisäksi määrittelin sienien ekologiset funktiot eli killat sekä trofiatasot FUNGuild -onlinetyökalun (Nguyen ym. 2016) avulla. FUNGuild tarjoaa yksinkertaisen ja johdonmukaisen tavan lajitella suuretkin sekvenssipoolit ekologisesti merkityksellisiin kategorioihin (Nguyen ym. 2016). Ekologinen funktio käsittää samoja resursseja luonnossa käyttävät lajit ja trofiataso kertoo eliön ravinnonkäyttötavan, kuten onko laji symbionttinen, lahottaja (saprotrofi) tai tautia aiheuttava loinen (patotrofi) (Hanski ym. 1998). FUNGuildista

saatujen ekologisen funktion ja trofiatason pohjalta jatkoin sienien luokittelua selkeämpiin ryhmiin pääjaksoittain (Liite: toiminnalliset ryhmät Taul. L4).

2.6 Tilastolliset analyysit

Aineiston tilastollinen analysointi suoritettiin R-ohjelmalla (R Core Team 2019) käyttäen paketteja *vegan* (Oksanen ym. 2019), *ggplot2* (Wickham 2016) ja *reshape* (Wickham 2007). Analyysijä varten muutin bakteerien ja sienien näytekohtaiset sekvenssilukumäärät prosenttiosuuksiksi. Sekä sieni-, että bakteeriyhteisöille tein samat tilastolliset analyysit.

Piirsin bakteerien ja sienien kolmelle ylimmälle taksonomiselle tasolle (pääjakso, luokka ja lahko), sekä sienien FUNGuild:n mukaan rakennetuille toiminnallisille ryhmille pylväskaaviot suurimpien ryhmien suhteellisista osuuksista lajikkeittain koe- ja kontrollialueilla. Sienien tilastollisista analyyseistä jätettiin pois Karin-pajulajikkeen näytteet KaaRe1 kontrollialueelta ja Ka45 koealueelta. Nämä poikkesivat muista näytteistä niin paljon, että muun muassa NMDS-ordinaatiokuvat eivät olleet kovinkaan kuvaavia näiden näytteiden kanssa (Liite: NMDS-paikkaordinaatiokuva sienille Kuva L1).

Analysoin sieni-, ja bakteeriyhteisöjen diversiteettiä käyttäen seuraavia indeksejä: lajirikkaus (Species Richness), tasaisuus (Pilou Evenness), monimuotoisuus (Shannon-Weaver), samankaltaisuus (Simpson) ja käänteinen samankaltaisuus (Inverted Simpson). Diversiteetti-indeksejä käytetään biologiassa kuvaamaan lajistollista monimuotoisuutta. Monimuotoisuus käsittää yleensä (1) lajirikkautta eli havaittujen lajien lukumäärää ja (2) lajien suhteellisen runsauden jakautumisen tasaisuutta. Indeksit eroavat toisistaan lajimäärän ja suhteellisten runsauksien painottamisessa. Diversiteetti-indeksit yksistään eivät kerro paljoa, vaan niiden käyttö perustuu näytteiden/mikrobiyhteisöjen väliseen indeksien vertailemiseen.

Species Richness diversiteetti-indeksi mittaa lajirikkautta eli lajien lukumäärää ja Pilou Evenness -indeksi kertoo lajien suhteellisen runsauden jakautumisesta. Shannonin (Shannon-Weaver) diversiteetti-indeksi kuvaa monimuotoisuutta huomioiden lajimäärän ja lajien suhteellisen runsauden vaihtelun. Pienen indeksiarvon omaavassa otoksessa on vähän lajeja ja huomattavaa vaihtelua lajien välisissä runsaussuhteissa. Suuren indeksiarvon omaavassa otoksessa lajikirjo on laajaa ja lajien väliset runsaussuhteet tasaisempia. Lajirikkaus painottuu indeksissä lajien runsaussuhteiden tasaisuutta enemmän ja harvinaisten lajien vaihteluun indeksi reagoi ”jokseenkin” herkästi. Simpsonin diversiteetti-indeksi (samankaltaisuusindeksi) mittaa todennäköisyyttä sille, että kaksi näytteen/yhteisön satunnaisesti valittua yksilöä kuuluvat samaan lajiin (tai kategoriaan). Hallitsevat eli dominantit lajit painottuvat tässä

indeksissä Shannonin indeksiä vahvemmin (Kiiski 2019). Indeksien arvo vaihtelee välillä 0-1 ja on sitä suurempaa, mitä suurempi monimuotoisuus eli mitä enemmän eri lajeja ja mitä tasaisemmat niiden väliset runsaussuhteet. Simpsonin diversiteetti-indeksi ei huomioi lajien kokonaismäärää, vaan kuvaa lajiston monipuolisuutta (Heikkinen 2017). Käänteinen samankaltaisuus on samankaltaisuudesta johdettu diversiteetti-arvo, jota pidetään muita alfa-diversiteettiä mittaavia parametreja parempana, koska se indikoi rikkaudesta (richness) yhteisössä, jolla on tasainen tasaisuus (evenness) jolla olisi sama monimuotoisuus (Tuntematon 2011).

Testasin tilastollista lineaarista mallia (lm) käyttäen koekäsittelyn (jätevesi), eri pajulajikkeiden (Gudrun, Karin, Klara ja Torangin maatiainen) ja pajujen biomassan vaikutusta pajujen mikrobiyhteisöjen mikrobiryhmiin, diversiteetti-indekseihin, sienien toiminnallisiin ryhmiin ja bakteerien yli 0,5 % -kokoisiin toiminnallisiin ryhmiin (PICRUST2). Mikrobiryhmistä testattiin kaikki pääjaksot ja niiden yli prosentin (> 1 %) suuruiset alaryhmit. Selittävinä muuttujina mallissa olivat lajike, käsittely ja biomassa. Lisäksi rakensin ja testasin erikseen käsittely ja pajulajikekohtaiset mallit (muuttujina pajulajike ja biomassa tai käsittely ja biomassa) sellaisille ryhmille, joilla havaittiin yhdysvaikutusta ensimmäisen lm-mallinnuksen muuttujien välillä. Lineaaristen mallien selittävyyttä testattiin varianssianalyysillä (ANOVA). ANOVA-tulosten perusteella tilastollisesti merkitseville ryhmille piirsin janakaaviot keskiarvolla ja vaihteluvälillä (0.2) erikseen käsittelylle, lajikkeelle ja käsittely-lajike-yhdysvaikutukselle. Lisäksi biomassan ollessa merkitsevä piirsin ryhmille korrelaatiokuvat biomassan kanssa ja testasin korrelaatiota biomassan ja mikrobiryhmien välillä käyttäen Pearsonin korrelaatiokerrointa. Piirrettyjä janakaavioita ja korrelaatiokuvia käytin lm-tulosten tulkitsemisen tukena. Tulosten tulkitsemisessa tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin $p < 0,05$, mutta taulukoissa on mukana suuntaa antamassa myös $p < 0,1$ -arvot.

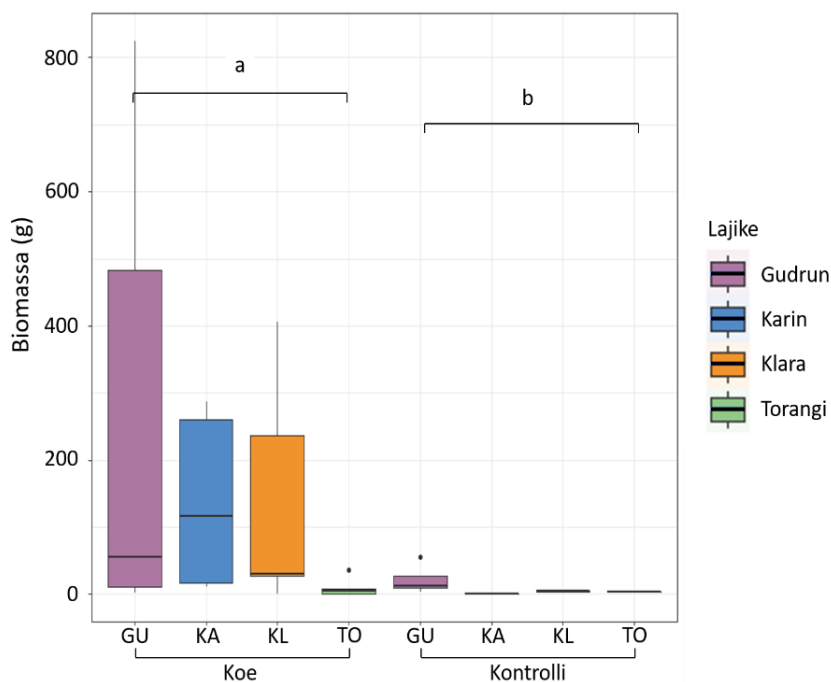
Käytin NMDS-ordinaatiomenetelmää (non-metric multidimensional scaling) mikrobiyhteisöjen lajistovaihtelun ja paikka/näytekohtaisen ryhmittymisen tarkasteluun. Yhteisöjen eroavuuksia tarkastelin adonis-komennon PERMANOVA-testillä (permutaatiot 9999). Eri muuttujien (lajike, käsittely, biomassa, FUNGuild:n ja PICRUST2:n toiminnalliset ryhmät, taksonomisten tasojen ryhmät ja diversiteetti-indeksit) sovittamisessa vektoreiksi NMDS-ordinaatiokuvaan käytin veganin envfit-komentoa, jossa testataan ympäristötekijöiden ja ordinaation korrelaatioiden merkitsevyyttä permutaatiotestillä (999 permutaatiota). Permutaatiotestin tulosten perusteella valitsin piirrettäviksi vektoreiksi alustavasti kaikki $p < 0,1$ arvon saaneet tekijät (Liitteet: NMDS-yhteisöordinaatioihin sovitettut ympäristömuuttujat

Taul. L5 ja L6). Vektoreiden määrän rajaamisessa hyödynsin lm-testeissä saatuja tuloksia. Bakteereilla otin mukaan alustavista vektoreista ne PICRUST2-vektorit, joilla lm-testien merkitsevyysarvo p oli alle 0,1 (3 kpl) ja taksonomisista tasoista ne, joilla lm-testien arvo oli merkitsevä ($p < 0,05$). Tämän jälkeen rajasin pois ne päällekkäiset taksonomiset alaryhmät, joista oli vektorina samankokoinen ja vaikutukseltaan samansuuntainen ylempi taksonominen ryhmä. Sienillä alustavia vektoreita oli paljon vähemmän kuin bakteereilla, joten rajasin pois vain tällaiset taksonomiset päällekkäiset ryhmät.

3 TULOKSET

3.1 Pajujen biomassa

Kontrollialueen pajujen versojen biomassat olivat selvästi alempia, kuin puhdistuskosteikon pajuilla (kuva 5, $p = 0,035$; Liite Taul. L7). Gudrunilla oli keskimäärin korkeimmat biomassat suurella hajonnalla ja Torangin maatiiaisella alimmat, mutta erot biomassoissa lajikkeiden välillä eivät olleet merkitseviä (kuva 5).



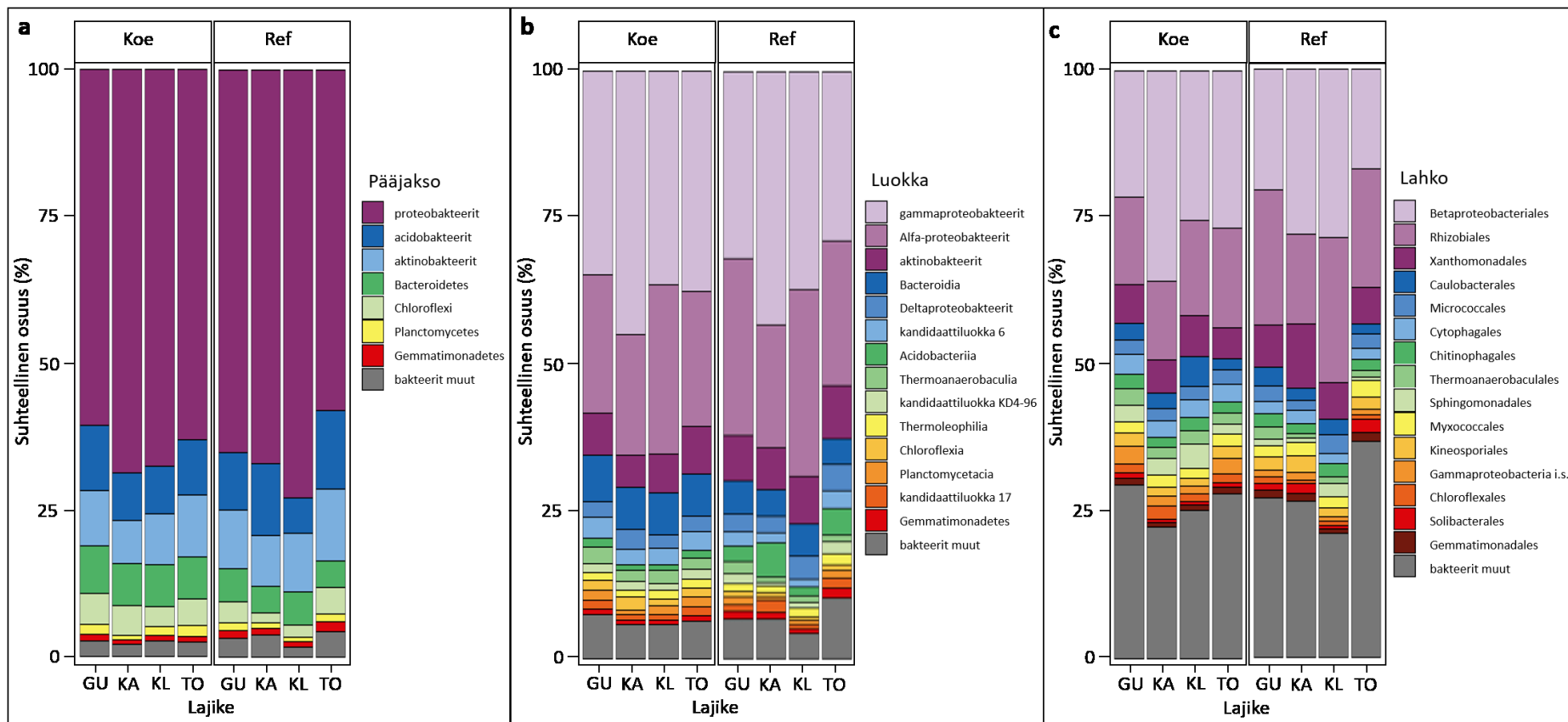
Kuva 5. Pajulajikkeiden (GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara, TO = Torangin maatiainen) biomassojen mediaani puhdistuskosteikolla ja kontrollialueella. Kirjaimet (a, b) kuvaavat tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä. Saman kirjaimen sisältävät yhteisöt eivät poikkea toisistaan tilastollisesti.

3.2 Bakteriyhteisöt

3.2.1 Bakteriyhteisöjen taksonomia

Yli 99,9 prosenttia bakteerisekvensseistä luokiteltiin vähintään pääjaksotasolle. Bakteerien yleisin pääjakso oli proteobakteerit (Proteobacteria) (65,2 %) ja muita runsaana havaittuja pääjaksoja olivat acidobakteerit (Acidobacteria) (9,8 %), aktinobakteerit (Actinobacteria) (9,3 %), Bacteroidetes (6,3 %) ja Chloroflexi (4,1 %) (kuva 6a).

Proteobakteereista suurimmat luokat olivat gamma- ja alfa-proteobakteerit (36,2 %; 25,9 %), sekä pienempi delta-proteobakteerien (3 %) luokka (kuva 6b). Gammaproteobakteereilla suurimpina ryhminä nousivat esiin Betaproteobacteriales-lahko (25 %; kuva 6c) ja suvut *Rhizobacter* ja *Rhodoferrax* (6 %; 2,8 %), sekä Xanthomonadales-lahko (6,7 %; kuva 6c) ja sen *Rhodanobacter*-suku (3,0 %). Alfa-proteobakteerit koostuivat pääosin Rhizobiales-lahkon (18 %; kuva 6c) lajeista, mutta runsaana havaittiin myös Caulobacterales-lahkon sukua *Phenylobacterium* (2,2 %). Muita keskimääräistä suurempia bakteeriryhmiä olivat aktinobakteerien aktinobakteerit-luokka (7,1 %; kuva 6b), Bacteroidetes-pääjakson Bacteroidia-luokka (6,2 %; kuva 6b) ja acidobakteerien ”kandidaattiluokka 6” (2,7 %; kuva 6b) ja ”kandidaattisuku 10” (2,1 %).

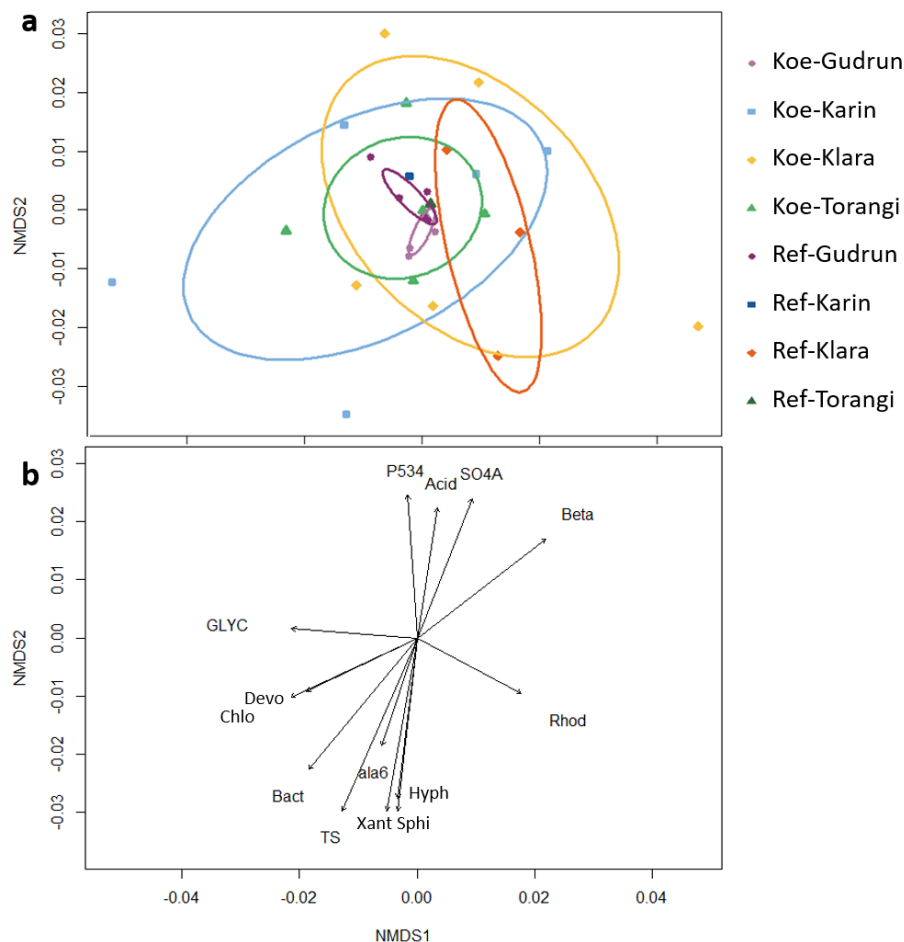


Kuva 6. Bakteerien pääjaksojen (a), luokkien (b) ja lahojen (c) suhteellinen osuus (%) pajulajikkeittain koe- ja kontrollialueilla. Määrittämättömät bakteerit sisältyvät ”bakteerit muut” -ryhmään, samoin kuin alle 1 %:n luokat ja lahkot. Koe = puhdistuskosteikko, Ref = referenssi eli kontrollialue, GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara ja TO = Torangin maatiainen.

3.2.2 NMDS-yhteisöordinaatio

Puhdistuskosteikolla ja kontrollialueella kasvaneiden pajujen juuriston bakteeriyhteisöt erosivat toisistaan (adonis, PERMANOVA; $p < 0,001$). NMDS-ordinaatiossa eri näyteryhmät sijoittuivat kuitenkin limittäin, eikä näyteryhmien välillä ollut havaittavissa eroja (kKuva 7a). Vain koealueella kasvaneen Karin-lajikkeen juurten bakteeriyhteisöt näyttivät kuvan perusteella poikkeavan hieman enemmän muista ja Gudrunin bakteeriyhteisöt olivat hyvin samankaltaisia eri käsittelyiden sisällä (kuva 7a).

Bakteerien yhteisömuutoksia selittivät vektoreina diversiteetti-indeksi tasaisuus, taksonomiset ryhmät Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteriia, acidobakteerien ”kandidaattiluokka 6”, Sphingomonadales, Betaproteobacteriales, Hyphomicrobiaceae, *Devosia*, *Rhodferax* ja Xanthomonadaceae, sekä PICRUST2-ohjelmalla määritellyt toiminnalliset ryhmät GLYCOLYSIS, PWY.5345 ja SO4ASSIM.PWY (kuva 7b). Koska NMDS-ordinaatiossa ei havaittu merkittäviä yhteisömuutoksia, vektoreita ei voitu tulkita niiden pohjalta ja tilastollisesti merkitsevät erot mikrobiyhteisöissä löytyivät lähinnä yksittäisiä näytteitä ja taksonomisia ryhmiä tarkasteltaessa.

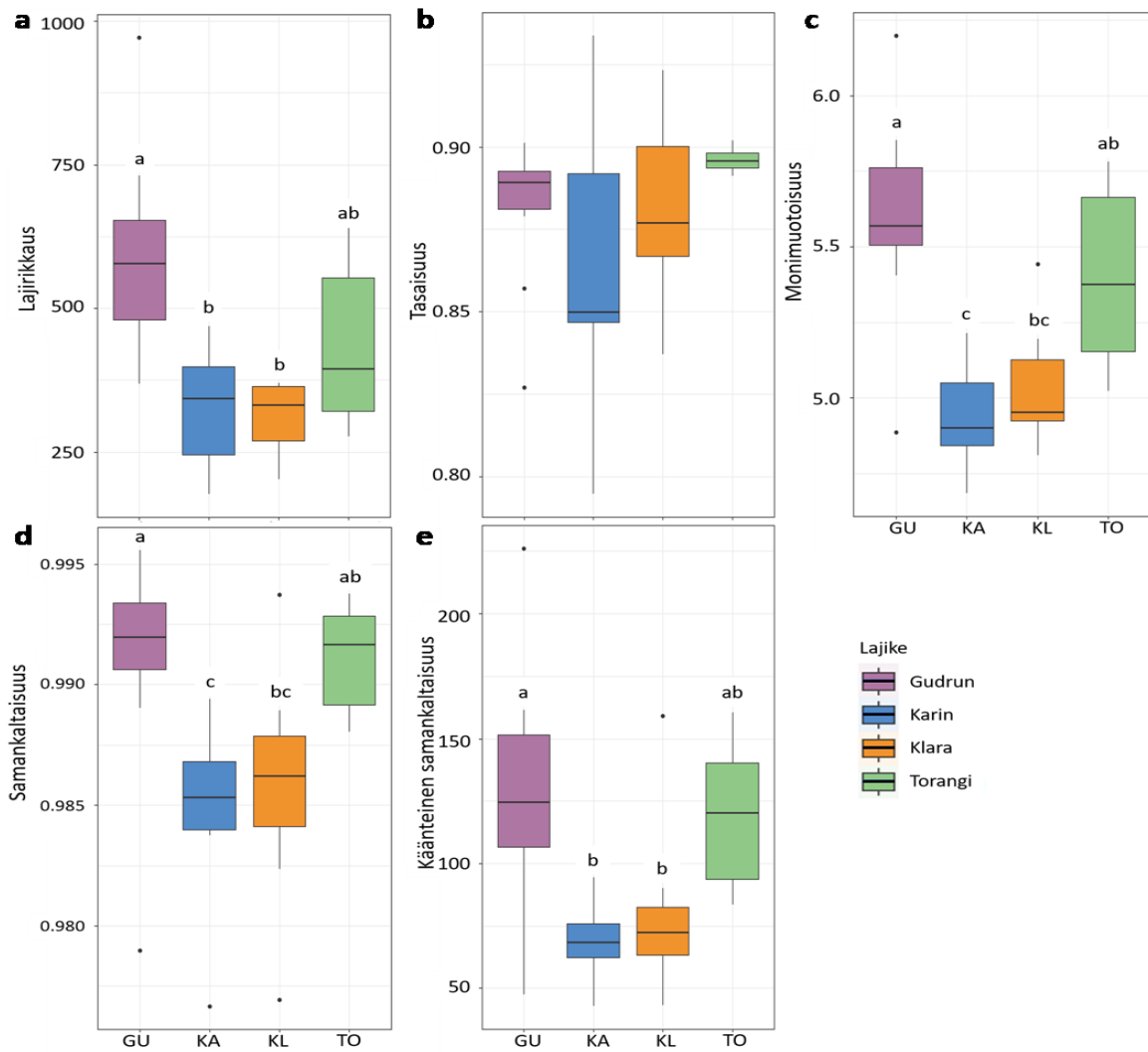


Kuva 7. a) NMDS-yhteisöordinaatio pajujen juurten bakteeriyhteisöjen eroista koe- ja kontrollialueella (Ref) kasvaneilla pajulajikkeilla. Yhteisöjen sijaintia kuvaavat ellipsit piirsin 95 %:n luottamusvälillä. **b)** Vektorit osoittavat niiden ympäristötekijöiden vaikutusten/kasvun suuntaa, joilla on lähes merkitsevä ($p < 0,1$) korrelaatio ordinaatiossa. Lyhenteet: TS = tasaisuus (diversiteetti-indeksi), Bact = Bacteroidetes, Chlo = Chloroflexi, Acid = Acidobacteriia, ala6 = acidobakteerien kandidaattiluokka 6, Sphi = Sphingomonadales, Beta = Betaproteobacteriales, Hyph = Hyphomicrobiaceae, Devo = *Devosia*, Rhod = *Rhodoferrax*, Xant = Xanthomonadaceae, GLYC = GLYCOLYSIS, P534 = PWY.5345, SO4A = SO4ASSIM.PWY. Koe = pajukosteikko, Ref = kontrollialue. Huom: Kontrollialueen (Ref) näytteitä pajuista Karin ja Torangin maatiainen oli molempia vain yksi kappale, jotka sijoittuvat kuvassa keskelle.

3.2.3 Bakteeriyhteisöjen monimuotoisuus

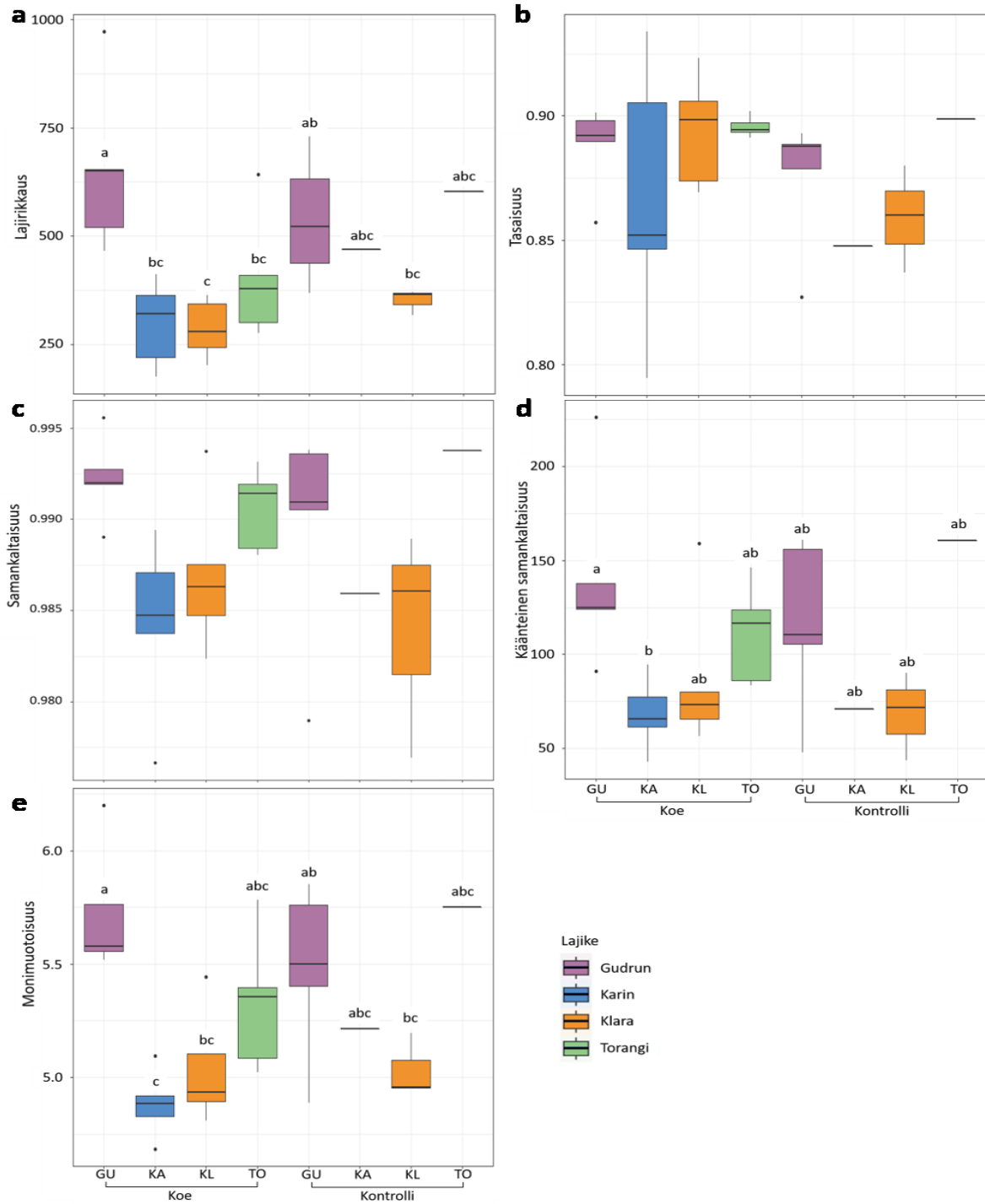
Eri pajulajikkeiden (Gudrun, Karin, Klara ja Torangin maatiainen) juuristojen bakteeriyhteisöt erosivat toisistaan lajirikkauden ($p = 0,002$), samankaltaisuuden (Simpsonin indeksi; $p = 0,027$, käänteinen Simpsonin indeksi; $p = 0,016$) ja monimuotoisuuden (Shannonin-Weaverin indeksi; $p < 0,001$), mutta eivät tasaisuuden suhteen (kuva 8; Liitteet: Taul. L8). Toisin kuin Permanova-testi näytti, diversiteetiarvojen perusteella koe- ja kontrollikäsittelyiden välillä juuriston bakteeriyhteisöissä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja, mutta pajujen biomassan kasvaessa bakteeriyhteisöjen käänteisen samankaltaisuuden havaittiin kasvavan (biomassan päävaikutus: $p = 0,039$; Pearson $r = 0,359$, $p = 0,051$) (Liitteet: Taul. L8).

Bakteerien lajirikkaus, monimuotoisuus (Shannonin-Weaverin indeksi) ja samankaltaisuus (Simpsonin indeksit) olivat suurimpia Gudrunilla. Gudrun erosi näiden parametrien suhteen Karinista ja Klarasta, mutta ei Torangin maatiaisesta (kuvat 8a, c, d ja e). Seuraavaksi eniten bakteeritaksoneita havaittiin Torangin maatiaisella. Torangin maatiaisen bakteeriyhteisöjen monimuotoisuus ja samankaltaisuus olivat lähempänä Gudrunilla, kuin Karinilla ja Klaralla havaittuja, mutta ero oli merkitsevä vain Karin-lajikkeeseen kanssa (kuvat 8c ja d). Karinilla ja Klaralla bakteerien lajirikkaus, monimuotoisuus ja samankaltaisuus olivat keskenään samaa luokkaa (kuvat 8a, c, d ja e).



Kuva 8. Pajulajikkeiden (GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara, TO = Torangin maatiainen) bakteeriyhteisöjen diversiteetti-indeksit lajirikkaus (a), tasaisuus (b), monimuotoisuus (c), samankaltaisuus (d) ja käänteinen samankaltaisuus (e). Kirjaimet (a, b, c) osoittavat tilastollisesti lähes merkitseviä eroja (Tukeyn testi) eri bakteeriyhteisöjen välillä ($P < 0,1$). Saman kirjaimen sisältävät yhteisöt eivät poikkea toisistaan tilastollisesti.

Koealueella kasvaneen Gudrunin bakteeriyhteisöjen lajirikkaus oli suurempaa, kuin koe- ja kontrollialueella kasvaneella Klaralla ja koealueella kasvaneilla Karinilla ja Torangin maatiisella (kuva 9a). Kontrollialueella Gudrunin bakteeriyhteisöjen lajirikkaus oli vain koealueella kasvaneen Klaran lajirikkautta suurempaa (kuva 9a). Bakteeriyhteisöjen tasaisuudessa ja samankaltaisuudessa ei havaittu merkitseviä eroja eri käsittelyissä kasvaneilla pajulajikkeilla (kuvat 9b ja c), mutta käänteinen samankaltaisuus oli suurempaa koealueella Gudrunilla kuin Karinilla (kuva 9d). Lisäksi bakteeriyhteisöjen monimuotoisuus oli suurempaa koealueella Gudrunilla, kuin koe- ja kontrollialueilla Klaralla tai koealueella Karinilla (kuva 9e). Kontrollialueella Gudrunin bakteeriyhteisöjen monimuotoisuus oli vain koealueen Karinia suurempaa (kuva 9e).



Kuva 9. Pajulajikkeiden (GU = Gudrun, KA = Karin, KL= Klara, TO = Torangiin maatiainen) bakteeriyhteisöjen diversiteetti-indeksit lajirikkaus (**a**), tasaisuus (**b**), samankaltaisuus (**c**), käänteinen samankaltaisuus (**d**) ja monimuotoisuus (**e**) koe- ja kontrollialueella. Kirjaimet (a, b, c) osoittavat tilastollisesti lähes merkitseviä eroja (Tukeyn testi) eri bakteeriyhteisöjen välillä ($P < 0,1$). Saman kirjaimen sisältävät yhteisöt eivät poikkea toisistaan tilastollisesti.

3.2.1 Bakteritaksonian suhteellinen runsaus eri käsittelyissä, pajulajikkeilla ja korrelaatio versobiomassan kanssa

Acidobakteerit -pääjakson suhteellinen runsaus oli suurinta Gudrun- ja Torangin maatiainen -lajikkeilla ja alhaisinta Klaralla (lajikkeen päävaikutus: $p = 0,039$; Liite Taul. L9 ja L10). Acidobakteerien Acidobacteriia-luokan bakteeritaksoneita havaittiin enemmän kontrollialueella (käsittelyn päävaikutus: $p < 0,001$), ja ”kandidaattiluokkaa 6” koealueella ($p = 0,009$). Erityisesti Gudrunilla ($p = 0,005$) ja Klaralla ($p = 0,003$) ”kandidaattiluokkaa 6” havaittiin enemmän koealueella. Lisäksi kontrollialueella ”kandidaattiluokan 6” suhteellinen runsaus oli sitä suurempaa, mitä suurempi oli pajujen biomassa ($p < 0,001$; Pearson $r = 0,829$, $p = 0,003$).

Armatimonadetes-pääjaksoa havaittiin runsaammin kontrollialueella kuin koealueella (käsittelyn päävaikutus: $p < 0,001$), erityisesti lajikkeilla Gudrun ($p = 0,003$) ja Karin ($p = 0,006$). Kontrollialueella Armatimonadetes-ryhmän bakteerien runsaus olikin korkeinta Gudrunilla ja Karinilla, sekä Torangin maatiaisella ja alhaisinta Klaralla (lajikkeen päävaikutus kontrollialueella: $p = 0,045$). Myös Gemmatimonadetes-pääjaksoa ($p = 0,022$) ja sen alaryhmiä (Gemmatimonadetes, Gemmatimonadales ja Gemmatimonadaceae; $p = 0,022$) havaittiin enemmän kontrollialueella. Lajikkeista Gemmatimonadetes-pääjaksoa ($p = 0,012$) ja alaryhmiä ($p = 0,011$) oli eniten Gudrunilla ja Torangin maatiaisella, minkä lisäksi pajujen versojen biomassan kasvaessa pääjakson ja sen alaryhmien suhteellinen runsaus kasvoi kontrollialueella ($p = 0,045$; Pearson $r = 0,642$, $p = 0,046$).

Bacteroidetes ($p = 0,041$), Planctomycetes ($p = 0,047$) ja Nitrospirae ($p = 0,012$) -pääjaksojen, sekä Bacteroidia ($p = 0,046$) ja Planctomycetacia ($p = 0,046$) -luokkien bakteeritaksonian suhteellinen runsaus oli suurempaa koealueella. Planctomycetes- (lajikkeen päävaikutus: $p = 0,018$) ja Planctomycetacia-ryhmien ($p = 0,021$) bakteereita oli eniten Gudrunilla ja Torangin maatiaisella, hieman vähemmän Klaralla ja vähiten Karinilla. Nitrospirae-ryhmän suhteellinen runsaus kasvoi pajujen biomassan kasvaessa (biomassan päävaikutus $p = 0,020$; Pearson $r = 0,538$, $p = 0,002$). Positiivinen korrelaatio versobiomassan kanssa havaittiin Nitrospirae-ryhmällä erikseen koe- ja kontrollialueilla, sekä lajikkeilla Gudrun, Karin ja Torangin maatiainen.

Chloroflexi-pääjaksoa (käsittelyn päävaikutus: $p = 0,006$) ja sen alaryhmiä Chloroflexia ($p = 0,004$), Chloroflexales ($p = 0,005$) ja Roseiflexaceae ($p = 0,009$) oli enemmän koealueella ja ero näkyi alaryhmissä erityisesti Torangin maatiaisella (Chloroflexia; $p = 0,005$). Pääjaksotasolla Chloroflexi-bakteereita havaittiin muita pajulajikkeita vähemmän Klaralla (lajikkeen päävaikutus: $p = 0,043$), kun taas alaryhmien Chloroflexia ($p = 0,051$),

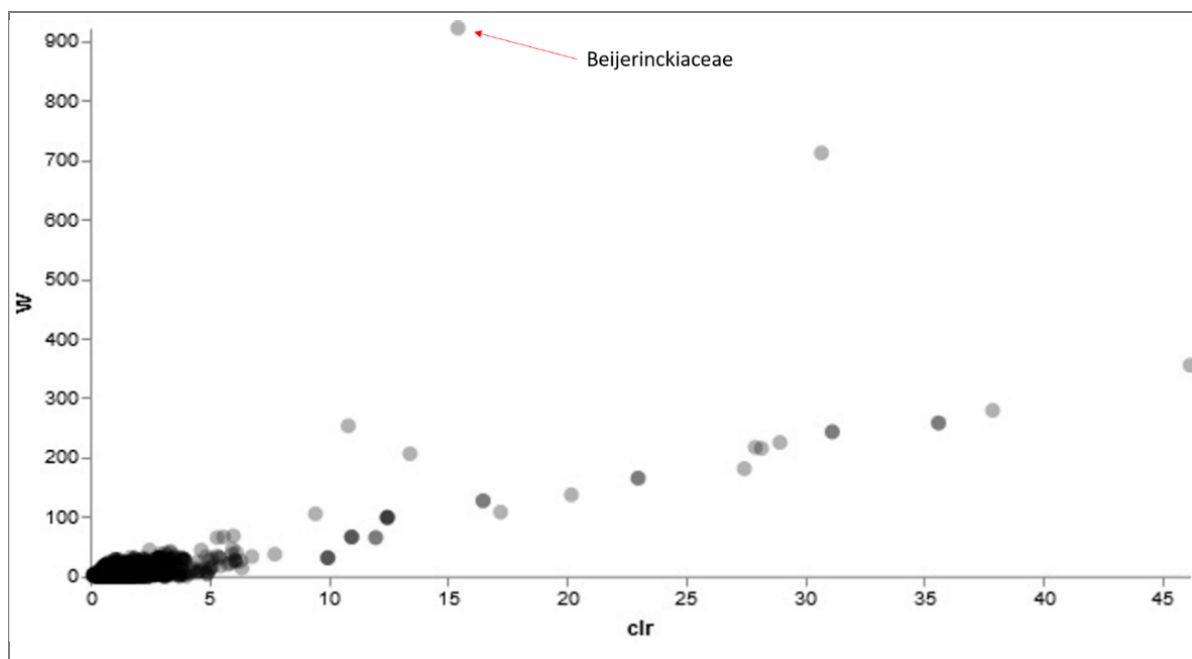
Chloroflexales ($p = 0,040$) ja Roseiflexaceae ($p = 0,043$) bakteereita havaittiin eniten Karinilla suurella hajonnalla. Lisäksi alaryhmien bakteerien suhteellinen runsaus kasvoi versobiomassan kasvaessa Torangin maatiiaisella (Chloroflexia; biomassan päävaikutus $p = 0,003$; Pearson $r = 0,872$, $p = 0,023$).

Proteobakteereita havaittiin lähes merkitsevästi eniten Gudrunilla ja Torangin maatiiaisella ($p = 0,063$). Alfaproteobakteerien Rhizobiales-lahkon ($p < 0,001$) ja Beijerinckiaceae ($p = 0,005$) ja Hyphomicrobiaceae ($p = 0,043$) -alaryhmien bakteerien suhteellinen runsaus oli suurempaa kontrollialueella, kun taas Rhizobiales-lahkon alaryhmiä Devosiaceae ($p = 0,003$), Rhizobiales i.s. ($p = 0,025$) ja *Bradyrhizobium* ($p = 0,016$) havaittiin enemmän koealueella. Torangin maatiiaisella Devosiaceae-heimon bakteerien suhteellinen runsaus oli sitä suurempaa, mitä suurempi oli lajikkeen biomassa ($p = 0,044$; Pearson $r = 0,840$, $p = 0,036$). Gammaproteobakteereista Xanthomonadaceae-heimoa ($p = 0,040$) havaittiin runsaammin koealueella ja Betaproteobacteriales-lahkon (lajike: $p = 0,029$) ja *Rhodoferrax*-suvun (lajike: $p = 0,006$) bakteerilajeja eniten Karinilla, tosin *Rhodoferrax*-sukua runsaasti myös Klaralla.

FCPU426-kandidaattipääjakson runsaus oli suurinta Klaralla ($p = 0,033$), mutta näytteiden välillä oli suurta hajontaa. Kontrollikäsittelyssä FCPU426-ryhmän bakteereita havaittiin runsaasti myös Torangin maatiiaisella ($p < 0,001$) ja Karinilla ryhmän bakteereita ei havaittu ollenkaan. Gudrunilla FCPU426-ryhmän bakteerien suhteellinen osuus kasvoi biomassan kasvaessa (biomassan päävaikutus: $p = 0,009$; Pearson $r = 0,852$, $p = 0,002$). Patescibakteerit-pääjakson bakteerien suhteellinen runsaus oli suurinta Gudrunilla ja Torangin maatiiaisella ($p = 0,003$) ja latescibakteerien bakteerien suhteellinen runsaus kasvoi pajujen biomassan kasvaessa ($p = 0,033$; Pearson $r = 0,385$, $p = 0,036$). Tunnistamattomaksi jääneitä bakteereita havaittiin enemmän kontrollialueella kuin puhdistuskosteikolla ($p < 0,001$).

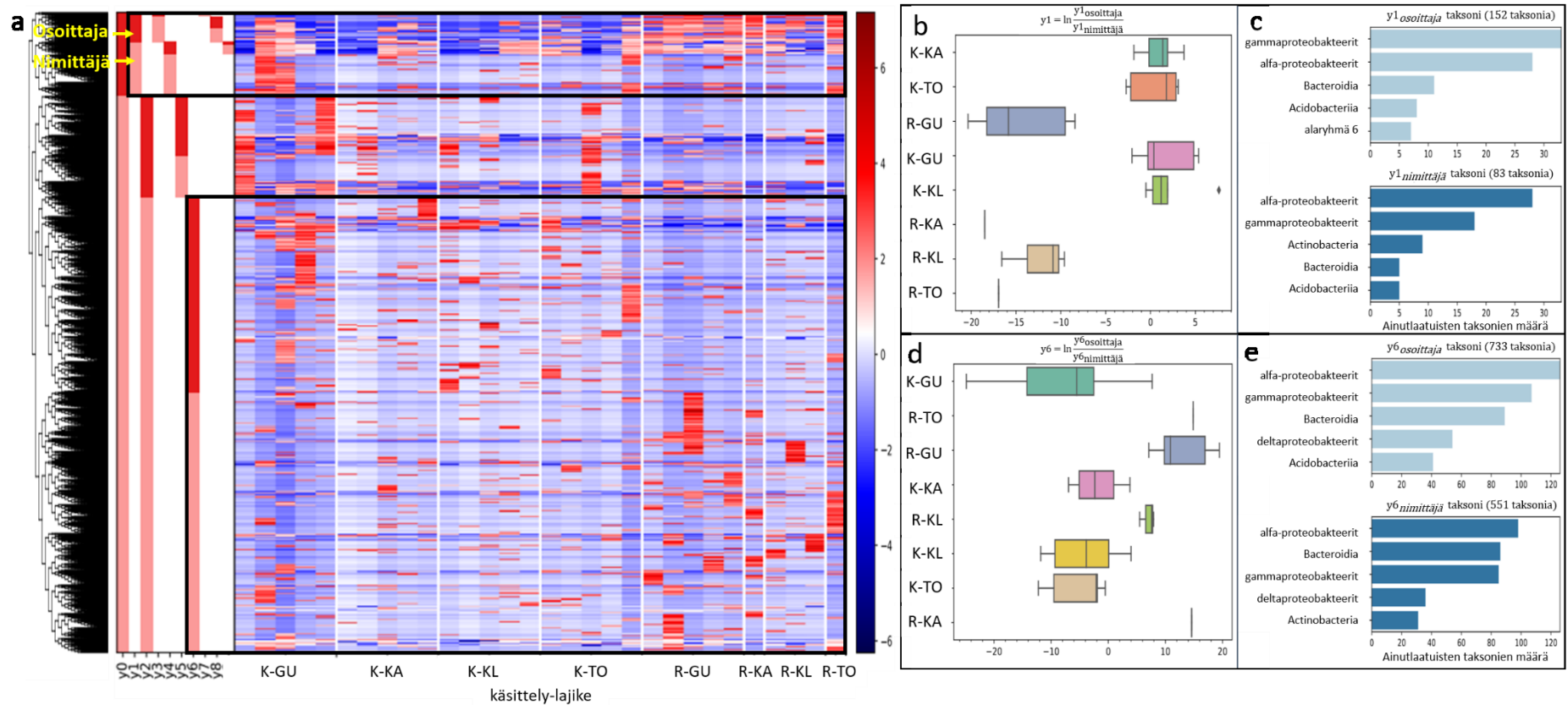
3.2.2 Bakteriyhteisön koostumuksen runsausanalyysit

Bakteereilla ANCOM-analyysin (QIIME2) havaitsema ainoa muista bakteeritaksoneista eroava ryhmä oli alfa-proteobakteerien Rhizobiales-lahkon Beijerinckiaceae-heimo (W = 922; kuva 10). Beijerinckiaceae-heimoa havaittiin kaikilla pajulajikkeilla runsaasti kontrollialueella, mutta vain vähän koealueella (Liite: Beijerinckiaceae-heimon sekvenssien prosenttipisterunsaudet Taul. L11).



Kuva 10. ANCOM-analyysityökalulla piirretty volcano-kaavio bakteeritaksoneiden eroavuuksista. Kaavion jokainen piste vastaa yhtä bakteeritaksonia. X-akselin clr-arvo (centered log-ratio) kuvaa taksonien vaikutuskokoeroa näytteiden välillä ja y-akselin W-arvo kertoo kuinka monen muun mikrobitaksan kanssa suhteellisten osuuksien logaritmitiset muutokset eroavat merkittävästi toisistaan eri näytteiden välillä. Pisteiden tummuusaste kertoo bakteeritaksoneiden runsaudesta.

Gneiss-analyysi (Balance Trees) havaitsi gamma- ja alfa-proteobakteerit, Bacteroidia, Acidobacteriia ja acidobakteerien ”kandidaattiluokka 6” -ryhmistä 152 ainutlaatuista taksonia (kuva 11c) y1-osoittajassa (kuva 11a), joiden runsaudet erosivat koealueen näytteissä verrattuna kontrollialueen pajunäytteisiin (kuva 11b). Alfa- ja gammaproteobakteerit, aktinobakteerit, Bacteroidia ja Acidobacteriia ryhmistä (kuva 11c) havaittiin y1-nimittäjässä 83 taksonia, joiden runsaudet erosivat myös koealueen ja kontrollialueen näytteissä. Ryhmistä alfa-, gamma- ja deltaproteobakteerit, sekä Bacteroidia ja Acidobacteriia havaittiin y6-osoittajassa 733 taksonia ja y6-nimittäjässä 551 ainutlaatuista taksonia (kuva 11e), joiden runsaudet erosivat koealueen näytteissä verrattuna kontrollialueen näytteisiin (kuva 11d).



Kuva 11 a) Osoittaja (punainen) ja nimittäjä (vaaleanpunainen) jakavat aineiston vertailtaviksi osayhteisöiksi ulkoisesti rakennetun puun perusteella. Käsittely-lajike osiossa nähdään kaikki näytteet näytetyypeittäin ja jokaisen näytteen eri osien saama värikoodattu "tasapainoindeksi" välillä tumma punainen (6) – tumma sininen (-6). Tasapainoindeksi vertaa taksonien keskinäisiä runsaussuhteita ja on sitä tummempi, mitä enemmän kahden verrattavan taksonin runsaudet eroavat toisistaan. **b)** y1-osoittajassa ja nimittäjässä havaittujen taksonien **(c)** runsaussuhteiden vaihtelu eri näytetyyppien välillä. **c)** Taksonomiset ryhmät, joista havaittiin runsaasti y1-osoittajan ja nimittäjän alueille ainutlaatuisia taksonia. **d)** y6-osoittajassa ja nimittäjässä havaittujen ainutlaatuisien taksonien **(e)** runsaussuhteiden vaihtelu eri näytetyyppien välillä. K = Koealue (puhdistuskosteikko), R = Referenssi (kontrollialue), GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara ja TO = Torangin maatiainen.

3.2.3 Bakteeriyhteisöjen toiminnallinen potentiaali (PICRUST2)

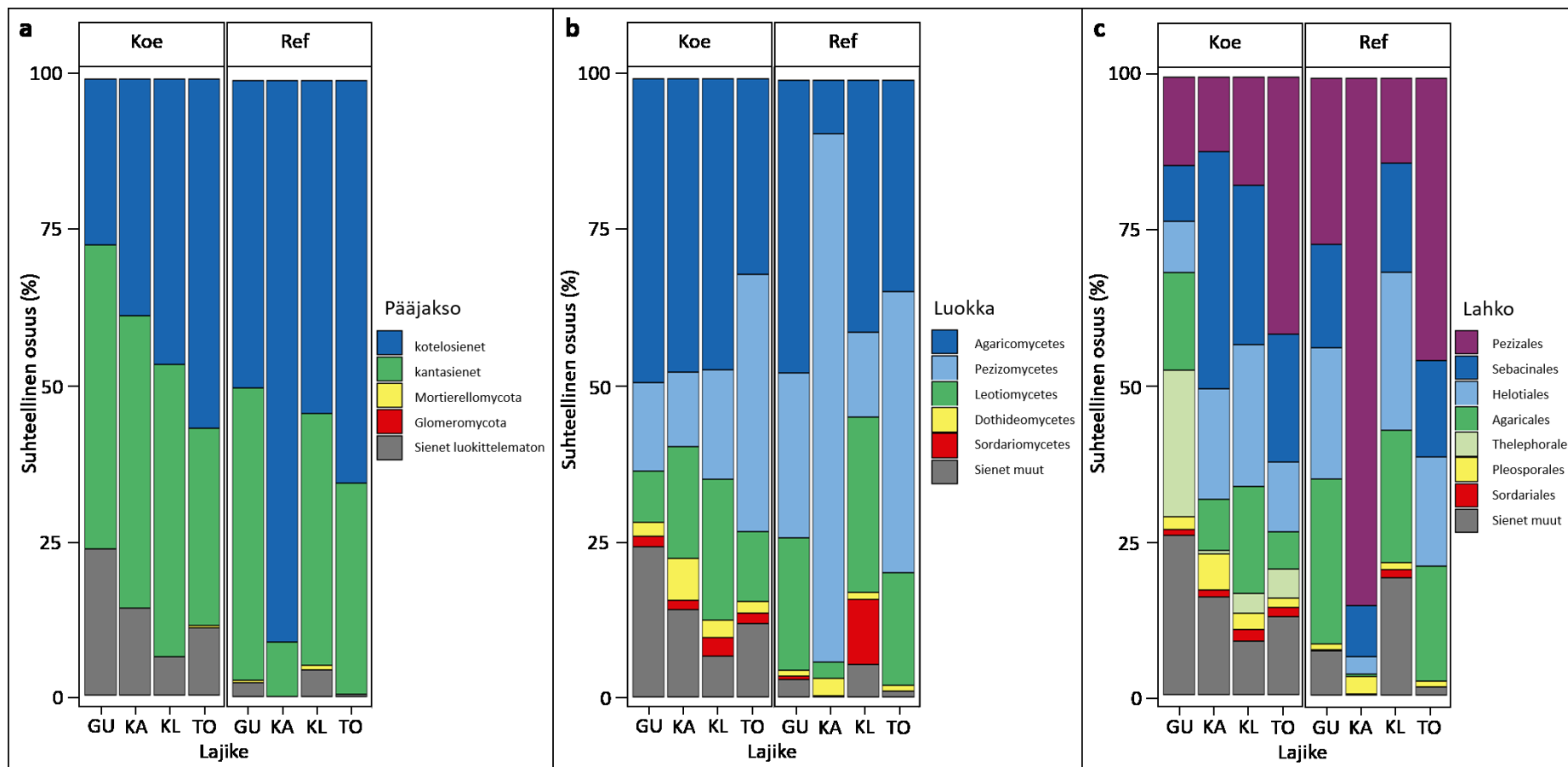
Bakteereille tehdyn PICRUST2 analyysin mukaan bakteerien yleisin biosynteesireitti oli PWY.3781 [aerobinen hengitys I (sytokromi c)] ja sen osuus kaikista havaituista biosynteesireiteistä oli 1,6 % (Liitteet: Taulukko L12). Biosynteesireittiä havaittiin jopa puolet enemmän Gudrun ja Torangin maatiainen -lajikkeilla kuin Karinilla ja Klaralla ($p = 0,058$). Myös biosynteesireittejä PWY.7208 (0,6 %) [superpathway pyrimidiini-nukleobaasien talteenottoon] ja PWY.7221 (0,6 %) [guanosiini-ribonukleotidien *de novo* biosynteesi] havaittiin eniten Gudrun ja Torangin maatiainen -lajikkeilla. Biosynteesireittiä PWY.7208 havaittiin Karinilla hieman enemmän kuin Klaralla ja biosynteesireittiä PWY.7221 havaittiin hieman enemmän Klaralla kuin Karinilla (PWY.7208: $p = 0,029$ ja PWY.7221: $p = 0,029$).

3.3 Sieniyhteisöt

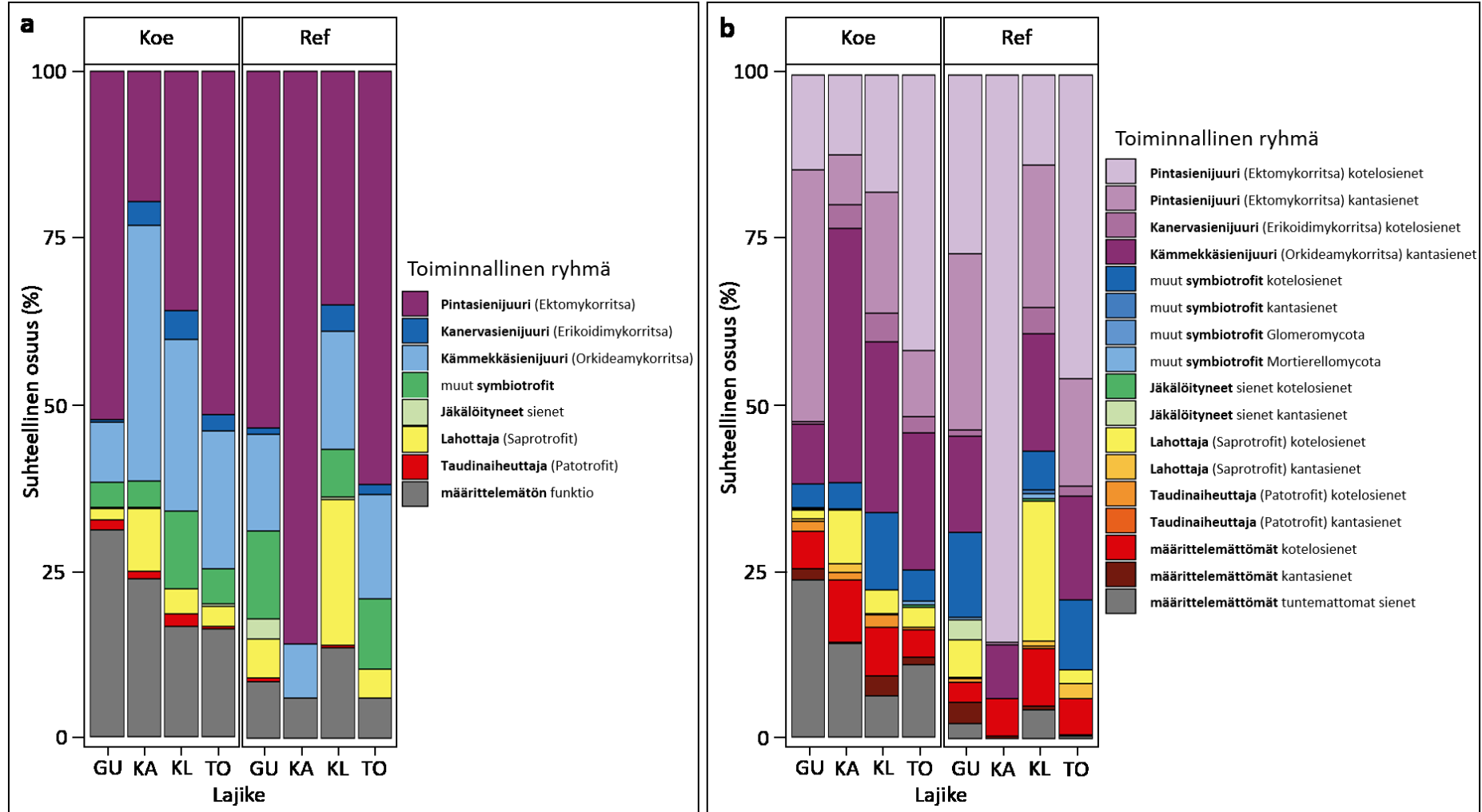
3.3.1 Sieniyhteisöjen taksonomia ja toiminnalliset ryhmät

Sienisekvensseistä yli 88,8 prosenttia luokiteltiin vähintään pääjaksotasolle yleisimpinä kotelo- (43,7 %) ja kantasienet (45,0 %; kuva 12a). Kotelosientien suurimmat ryhmät olivat Pezizomycetes-luokka (23,7 %; kuva 12b), sen Pezizales-lahko (23,7 %; kuva 12c) ja suvut *Peziza* (16,4 %) ja *Geopora* (7,3 %), sekä Leotiomycetes-luokka (15,2 %), sen Helotiales-lahko (14,9 %) ja suvut *Cadophora* (4,3 %) ja *Phialocephala* (2,9 %). Kantasienillä havaittiin vain Agaricomycetes-luokan (44,9 %) sieniä (kuva 12b), jonka suurimmat alaryhmät olivat Sebaciales-lahko (18,1 %) ja sen *Serendipita*-suku (17,7 %), Agaricales-lahko (16,8 %) ja sen *Inocybe*-suku (14,3 %), sekä Thelephorales-lahko (8,7 %) ja sen *Tomentella*-suku (8,2 %). Tilastollisten testien ulkopuolelle jätetyn kontrollialueen ainoan Karin-pajulajikkeen sieniyhteisön havaittiin koostuvan pääosin Pezizales-lahkon sienilajeista (yli 85 %; kuva 12c).

Suurimmat sienien toiminnalliset ryhmä olivat pintasienijuuret (48,3 %; kuva 13a), joista puolet oli kotelosieniä (23,8 %) ja puolet kantasieniä (24,5 %; kuva 13b). Toinen suuri ryhmä olivat kämmekkäsienijuuret (17,7 %), jotka koostuivat pelkästään kantasienistä. Myös jäkälöityneiden sienten ryhmässä (0,8 %) havaittiin runsaammin kanta- (0,7 %), kuin kotelosieniä (0,2 %). Muiksi symbiotrofeiksi (7,0 %) luokitelluista sienilajeista, lahottajasienistä (5,1 %) ja taudinaiheuttajasienistä (0,9 %) pääosa oli kotelosieniä (6,7 %; 4,7 %; 0,9 %) ja kanervasienijuuriksi (1,8 %) luokitellut sienet olivat kaikki kotelosieniä. Lähes viidesosalle sienistä (18,4 %) ei pystytty määrittämään toiminnallista ryhmää ollenkaan. Näistä kotelosieniä oli 5,7 %, kantasieniä 1,6 % ja tunnistamattomia sieniä 11,1 %.



Kuva 12. Sienten pääjaksojen (a), luokkien (b) ja lahkojen (c) suhteellinen osuus pajulajikkeittain koe- ja kontrollialueilla. Määrittämättömät sienet sisältyvät ”sienet luokittelematon”/”sienet muut” -ryhmään, samoin kuin alle 1 %:n luokat ja lahkot. Koe = pajukosteikko, Ref = kontrollialue, GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara ja TO = Torangin maatiainen.

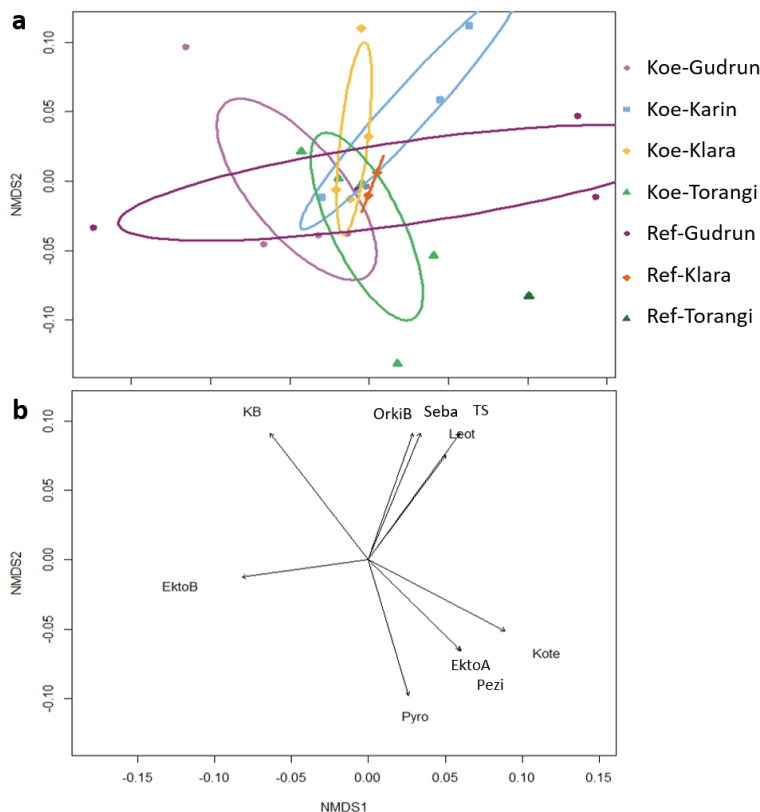


Kuva 13. Sienien toiminnalliset ryhmät (a ja b) lajikkeittain koe- ja kontrollialueilla. Koe = pajukosteikko, Ref = kontrollialue, GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara ja TO = Torangin maatiainen.

3.3.2 NMDS-yhteisöordinaatio

PERMANOVA-testin perusteella koe- ja kontrollialueella kasvaneiden pajujen juuriston sieniyhteisöt erosivat toisistaan (adonis; $p < 0,01$), mutta NMDS-ordinaatiokuvissa eri näytetyypit sijoittuivat limittäin, eikä näyteryhmien välillä ollut havaittavissa eroja (kuva 14a).

Sienillä yhteisömuutoksia selittäviä vektoreita olivat pajujen versojen biomassa, mikrobiyhteisön diversiteetti-indekseistä tasaisuus, taksonomisista ryhmistä kotelosienet, Leotiaceae, Pezizomycetes, Pyronemataceae ja Sebacinales, sekä toiminnallisista ryhmistä kämmekkäsienijuurta muodostavat kantasienet ja pintasienijuurta muodostavat kotelo- ja kantasienet (kuva 14b). Vektoreita ei kuitenkaan voitu tulkita NMDS-ordinaatiokuvien pohjalta, koska niissä ei havaittu merkittäviä yhteisömuutoksia. Tilastollisesti merkitsevät erot mikrobiyhteisöissä löytyivät lähinnä yksittäisiä näytteitä ja taksonomisia ryhmiä tarkasteltaessa.



Kuva 14. a) NMDS-yhteisöordinaatio pajujen juurten sieniyhteisöjen eroista koe- ja kontrollialueella (ref) kasvaneilla pajulajikkeilla. Yhteisöjen sijaintia kuvaavat ellipsit piirsin 95 %:n luottamusvälillä. **b)** Vektorit osoittavat niiden ympäristötekijöiden vaikutusten/kasvun suuntaa, joilla on lähes merkitsevä ($P < 0,1$) korrelaatio ordinaatiossa. Lyhenteet: KB = Kuivabiomassa, TS = tasaisuus (diversiteetti-indeksi), Kote = Kotelosienet, Leot = Leotiaceae, Pezi = Pezizomycetes, Pyro = Pyronemataceae, Seba = Sebacinales, EktoA = Ektomykorritsa eli pintasienijuurta muodostavat kotelosienet, EktoB = Pintasienijuurta muodostavat kantasienet, OrkiB = Orkideamykorritsa eli kämmekkäsienijuurta muodostavat kantasienet. Koe = pajukosteikko, Ref = kontrollialue.

3.3.3 Sieniyhteisöjen monimuotoisuus

Sienille tehdyissä diversiteetti-indekseissä (lajirikkaus, tasaisuus, samankaltaisuus, käänteinen samankaltaisuus ja monimuotoisuus) ei havaittu mikrobiyhteisöissä tilastollisia eroja eri käsittelyiden ja pajulajikkeiden välillä, eikä biomassan kasvaessa.

3.3.4 Sienitaksonien ja toiminnallisten ryhmien suhteellinen runsaus eri käsittelyissä, pajulajikkeilla ja korrelaatio biomassan kanssa

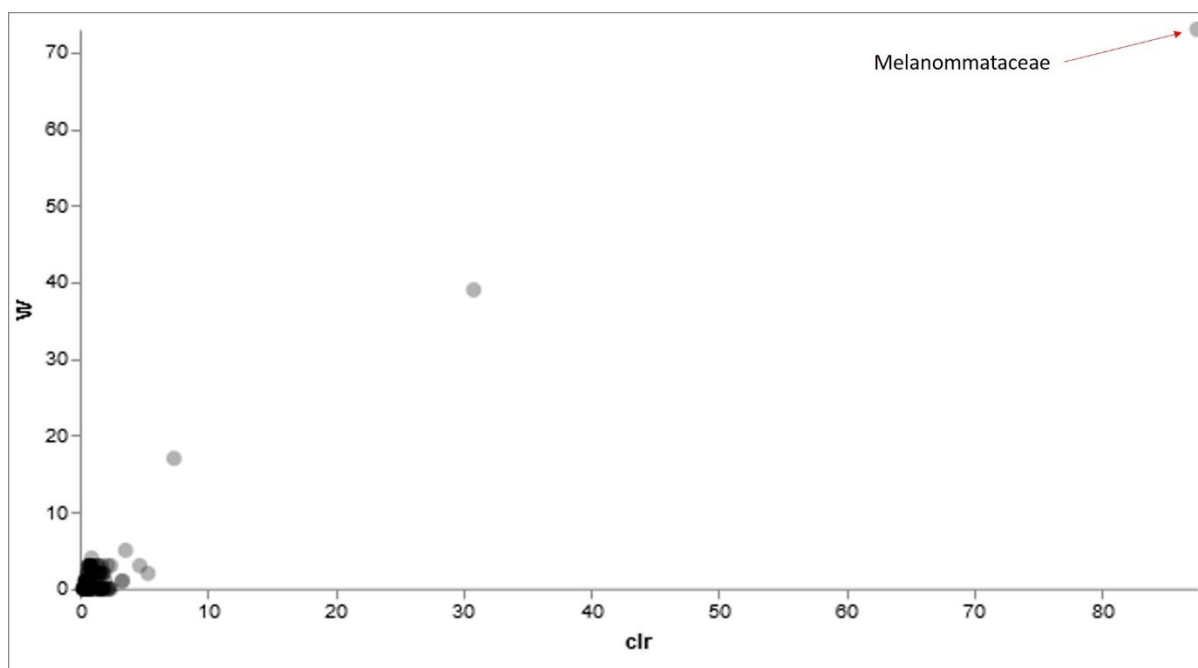
Mortierellomycota-pääjakson sienien suhteellinen runsaus oli Klaran juurissa suurempaa kontrollialueella kuin koealueella ($p = 0,014$; Liite Taul. L13 ja L14). Muutoin sienien neljästä pääjaksosta (kotelosienet, kantasienet, Glomeromycota ja Mortierellomycota) vain kotelosienien alaryhmien suhteellisilla runsauksilla havaittiin tilastollisesti merkitsevää yhteyttä käsittelyyn, pajulajikkeeseen ja/tai pajujen biomassan kanssa.

Kotelosienien Dothideomycetes-luokan (lajikkeen päävaikutus $p = 0,044$) ja sen alaryhmien (Pleosporales, Lingomycetaceae ja *Clohesyomyces*) sienilajien suhteellinen runsaus oli suurinta Karinilla. Myös Leotiomyces-luokan Leotiaceae-heimon ($p < 0,001$) sienilajeja havaittiin eniten Karin-lajikkeelta, josta oli sieninäytteet vain koealueelta. Tästä huolimatta Leotiaceae-heimoa (käsittelyn päävaikutus $p < 0,001$), kuten myös Vibrisseaceae-heimoa ($p = 0,024$) ja Sordariomycetes-luokkaa ($p = 0,046$) havaittiin runsaammin kontrollialueella kuin koealueella. Sordariomycetes-luokan sienilajeja havaittiin lisäksi eniten Klaralla (lajikkeen päävaikutus $p < 0,001$).

Pintasienijuurisieniä oli puhdistuskosteikolla kasvaneilla Gudrunilla ja Torangin maatiaisella noin puolet kaikista taksoneista, muilla pajuilla osuus oli 20-30 % (kuva 13a). Sen sijaan kontrollialueella suurin osuus pintasienijuurista (yli 80 %) oli kontrollialueen ainoassa Karin-näytteessä. Pajujen pintasienijuurista noin puolet oli kantasieniä ja puolet kotelosieniä (kuva 13b). Kotelosienten Pezizaceae-heimon ja sen *Peziza*-suvun sienitaksonien suhteellinen runsaus oli Gudrunilla sitä suurempaa, mitä suurempi oli pajujen biomassa (biomassan päävaikutus $p = 0,047$; Pearson $r = 0,363$, $p = 0,337$). Jäkälöityneitä kotelosieniä havaittiin runsaimmin Torangin maatiaisella koealueella ja Klaralla kontrollialueella (lajikkeen ja käsittelyn yhdysvaikutus: $p = 0,025$; Liite Taul. L15 ja L16). Lahottajasieniä havaittiin eniten kontrollialueella ($p < 0,001$) ja lajikkeista Klaralla ja Karinilla ($p = 0,008$), kuten myös lahottajakotelosieniä (käsittely: $p = 0,001$; lajike $p < 0,001$).

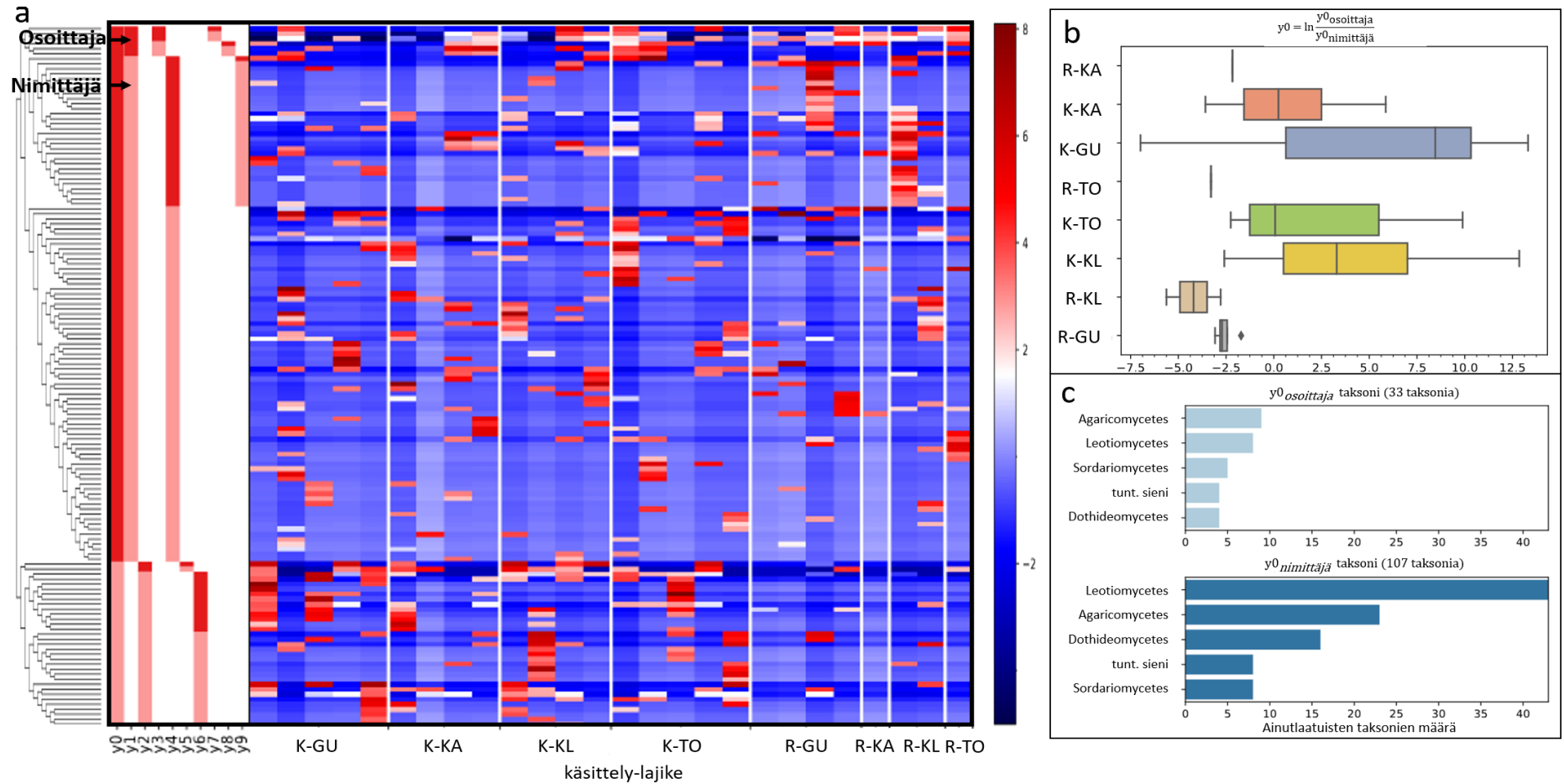
3.3.5 Sieniyhteisöjen koostumuksen runsausanalyysit

ANCOM-analyysin (QIIME2) havaitsema ainoa muista sienien taksonista eroava ryhmä oli kotelosienien Pleosporales-lahkon Melanommataceae-heimo ($W = 73$; kuva 15). Melanommataceae-heimoa havaittiin runsaasti kontrollialueella kasvaneella Karin-lajikkeella, mutta ei muilla pajulajikkeilla, eikä koealueella (Liite: Melanommataceae-heimon sekvenssien prosenttipisterunsaudet Taul. L17).



Kuva 15. ANCOM-analyysityökalulla piirretty volcano-kaavio sienitaksoneiden eroavuuksista. Kaavion jokainen piste vastaa yhtä sienitaksonia. X-akselin clr-arvo (centered log-ratio) kuvaa taksonien vaikutuskokoeroa näytteiden välillä ja y-akselin W-arvo kertoo kuinka monen muun mikrobitaksan kanssa suhteellisten osuuksien logaritmiset muutokset eroavat merkittävästi toisistaan eri näytteiden välillä. Pisteiden tummuusaste kertoo sienitaksoneiden runsaudesta.

QIIME2:n Gneiss-analyysi (Balance Trees) havaitsi Agaricomycetes, Leotiomycetes, Sordariomycetes, ”tuntematon sieni” ja Dothideomycetes -ryhmistä 33 ainutlaatuista taksonia (kuva 16c) y0-osoittajassa (kuva 16a) ja 107 ainutlaatuista taksonia y0-nimittäjässä, joiden runsaudet erosivat koealueen näytteissä verrattuna kontrollialueen pajunäytteisiin (kuva 16b)



Kuva 16. a) Osoittaja (punainen) ja nimittäjä (vaaleanpunainen) jakavat aineiston vertailtaviksi osayhteisöiksi ulkoisesti rakennetun puun perusteella. Käsittely-lajike osiossa nähdään kaikki näytteet näytetyypeittäin ja jokaisen näytteen eri osien saama värikoodattu ”tasapainoindeksi” välillä tumma punainen (8) – tumma sininen (-4). Tasapainoindeksi vertaa taksonien keskinäisiä runsaussuhteita ja on sitä tummempi, mitä enemmän kahden verrattavan taksonin runsaudet eroavat toisistaan. **b)** Osoittajassa ja nimittäjässä havaittujen taksonien runsaussuhteiden vaihtelu eri näytetyyppien välillä. **c)** Taksonomiset ryhmät, joista havaittiin runsaasti osoittajan ja nimittäjän alueille ainutlaatuisia taksonia. K = Koealue (pajukosteikko), R = Referenssi (kontrollialue), GU = Gudrun, KA = Karin, KL = Klara ja TO = Torangin maatiainen.

4 POHDINTA

Pajujen juurten bakteeriyhteisöt koostuivat pääosin proteo-, acido- ja aktinobakteereista sekä Bacteroidetes ja Chloroflexi-ryhmistä. Sieniyhteisöjen suurimpia ryhmiä olivat kotelo- ja kantasienet. Nämä bakteeri- ja sieniryhmät ovat Suomen pohjoisessa maaperässä ja kasvien juurissa yleisiä (Männistö ym. 2007; Vestberg ja Timonen 2018). Monissa näistä pajuilla havaituista mikrobiryhmistä on aiemmissa tutkimuksissa löydetty yhteyttä bioremediaatioon, muutoksiin ravinnemäärissä ja kosteudessa, sekä kasvien parempaan kasvuun ja selviytymiseen (mm. Sun ym. 2010; Zhang ym. 2013; Bedard 2008; Saravesi ym. 2015). Sienisymbiontien ja bakteerien lisäksi myös arkeoneilla voi olla tärkeä merkitys jätevesien puhdistuksessa (Pan ym. 2018), mutta ne jäivät tämän tarkastelun ulkopuolelle.

4.1 *Bakteerien ja sienten toiminnalliset ryhmät*

Bakteerien toiminnallisia ryhmiä pajujen juuristossa erotettiin tärkeiden biosynteesireittien avulla. Lajikkeista Gudrunilla ja Torangin maatiaisella havaittiin Karinia ja Klaraa enemmän bakteerien perustason metaboliaan liittyviä biosynteesireittejä PWY.7208 (pyrimidiini-nukleobaasien talteenotto) ja PWY.7221 (guanosini-ribonukleotidien biosynteesi). Näiden lisäksi myös bakteereilla yleisimpänä havaittua maaperän hengitykseen liittyvää PWY.3781 (aerobinen hengitys) -biosynteesireittiä näytti olevan runsaimmin Gudrunilla ja Torangin maatiaisella. Tiedetään, että maaperän hengitykseen liittyvän biosynteesireitin runsautta voi nostaa typen lisäyksen aiheuttama bakteerilajien runsaussuhteiden muuttuminen (Wang ym. 2019). Typeä saaneella koalueella biosynteesireittiä (PWY.3781) ei kuitenkaan havaittu kontrollialuetta enemmän, mutta Gudrunilla ja Torangin maatiaisella oli runsaimmin maaperän hengityksen lisääntymiseen liitettyjä bakteeriryhmiä. Wang ym. (2019) yhdisti typen lisäyksen aiheuttamat muutokset maaperän hengityksessä acidobakteerien, Planctomycetes ja Chloroflexi-bakteeriryhmien runsauden kasvuun, sekä proteobakteerien ja Bacteroidetes -ryhmien runsauden laskuun. Näistä Gudrunilla ja Torangin maatiaisella havaittiin muita pajuja runsaammin acidobakteereita, sekä Planctomycetes ja Chloroflexi-ryhmiä, joista Chloroflexiä runsaasti myös Karinilla. Lisäksi proteobakteereita näytti olevan Gudrunilla ja Torangin maatiaisella vähemmän, kuin Karinilla ja Klaralla, mutta Bacteroidetes-ryhmän runsaudessa ei havaittu eroja lajikkeiden välillä. Vaikka maaperän hengitykseen liittyvän biosynteesireitin PWY.3781 määrässä ei havaittu eroja käsittelyiden välillä, niin Planctomycetes-ryhmää ja Chloroflexiä, sekä vastoin Wang et al (2019) tuloksia myös Bacteroidetes-ryhmää havaittiin

pajuilla runsaammin tyypeä jäteveden mukana saaneella koealueella kuin kontrollialueella. Planctomycetes-ryhmällä ja Chloroflexillä koealueelle tullut typpi on todennäköisesti vaikuttanut runsauteen, mutta Bacteroidetes-ryhmän runsauteen on mahdollisesti vaikuttaneet muut jäteveden mukana kosteikolle tulleet epäpuhtaudet.

Juurisienet ovat merkittäviä kasvien ravinteiden saantia parantavia symbiontteja mm. lisäten kasvien hienojuurien haaroittumista ja kasvattaen ravinteidenoton maatilavuutta moninkertaistavaa ulkorihmastoa (Vestberg ja Timonen 2018). Pajujen juurista tunnistetuista sienistä pääosa oli pintasienijuurisieniä (48,3 %) koostuen puoliksi kotelo- ja kantasienistä. Pintasienijuuria muodostavat suurimmaksi osin kantasienet (Vestberg ja Timonen 2018), mutta pajukosteikon kaltaisissa häirityissä ympäristössä kotelosienisymbiontit ovat varsin tyypillisiä (Jumpponen 2007). Pajuilla havaitut pintasienijuuria muodostavat kantasienet koostuivat Agaricomycetes-ryhmän lajeista sisältäen mm. pajuille yleisestikin tyypillisiä helttasienilajeja (*Agaricales*). Monimuotoinen Agaricomycetes-luokka tunnetaan pääosin lahottajista (Timonen ja Valkonen 2013), mutta lahottajasienien ja pintasienijuurien lisäksi ryhmästä löydettiin pajuilla ainakin jäkälöityneitä ja kämmekkäsienilajeja. Agaricomycetes-ryhmässä oli pajuilla eroja käsittelyiden välillä, mutta ne olivat mahdollisesti pienissä (< 0,01 %) tilastollisen tarkastelun ulkopuolelle jääneissä ryhmissä.

Sienijuurisienet yhdessä muiden hajottajamikrobien kanssa vaikuttavat maaperän ravinteiden kiertoon (Timonen ja Valkonen 2013). Pajuilla havaitut Sordariomycetes, Dothideomycetes ja Leotiomyces -luokat, sekä jälkimmäiseen kuuluvat Leotiaceae- ja Vibrisseaceae-heimot ovat kaikki tärkeitä taksonomisia sieniryhmiä hiilen kierrossa ja kasviaineksen hajotuksessa (Timonen ja Valkonen 2013; Goodwin ja Kema 2009; Maharachchikumbura ym. 2016). Useat näiden ryhmien taksoneista luokitteivatkin pajuilla toiminnalliseen lahottaja(kotelo)sienien ryhmään. Lahottaja(kotelo)sieniä, sekä Sordariomycetes-, Dothideomycetes-, Leotiaceae- ja Vibrisseaceae-ryhmiä havaittiin runsaimmin Klaralla ja Karinilla, sekä Dothideomycetes-ryhmää lukuun ottamatta kontrollialueella. Mahdollisesti jäteveden mukana tulleet lisäravinteet ovat voineet vähentäneet lahottaja(kotelo)sienien symbionttista tarvetta pajuilla koealueella. Klaralla havaittiin erityisesti Sordariomycetes-ryhmän sieniä, kun taas Karinilla runsaammin Dothideomycetes ja Leotiaceae -sieniryhmiä. Valitettavasti kontrollialueen ainoa Karin-näyte jätettiin pois tilastollisista testeistä, sillä se poikkesi muista pajunäytteistä huomattavasti koostuen pääosin pelkistä Pezizales-sienilahkon lajeista. Todennäköisesti Dothideomycetes-luokan sieniä olisi myös havaittu runsaammin kontrollialueella, sillä ANCOM-analyysissä mukana olleesta

kontrollialueen Karin-näytteestä nousi esiin pieni Dothideomycetes-luokan Melanommataceae-heimo eroten muista sienitaksoneista.

Pintasienijuuret ovat metsäpuiden merkittävin sienijuurisymbioosityyppi (Timonen ja Valkonen 2013), mutta pajuilla on yleisesti myös keräsienijuurta muodostavia Glomeromycotina-alakaaren taksoneita (Vestberg ja Timonen 2018). Valitettavasti PCR:ssä käyttämämme alukkeet eivät tiedetysti monista keräsieniä kovin hyvin (Ihrmark ym. 2012), minkä vuoksi emme juurikaan havainneet niitä pajuilla. Toisaalta ei kuitenkaan osata sanoa onko pajuilla ollut keräsieniä, sillä mm. pajuilla keräsienijuurikolonisaatio on usein alhainen, esim. hanhenpajulla *Salix repens* (Van Der Heijden ja Vosatka 1999; Saravesi ym. 2011). *Salicaeae*-heimoon samoin kuuluvalla haavalla (*Populus*) on myös useissa tutkimuksissa havaittu keräsienten matalaa ja vaihtelevaa esiintyvyyttä, mikä on yhdistetty kasvin genotyyppiin ja ympäristötekijöihin, kuten liika kosteus ja kylmyys (Liu ym. 2016; Bonito ym. 2014). Lisäksi keräsienijuurien kehittymiselle epäedullisia oloja voivat olla myös kuivuus, matala pH (Brundrett 2009) tai maaperän turvepitoisuus (Vestberg ja Timonen 2018), jotka ovat yleisiä ominaisuuksia pohjoiselle maaperälle. Torangin tutkimusalueen maaperätyyppejä ei kuitenkaan ole näiltä osin analysoitu.

Myös muita symbiotrofisia sienitaksoneita havaittiin, joista valtaosa kotelosieniä. Näihin kuuluvat esimerkiksi endofyyttiset sienet eli sisäsienet, joita voidaan tavata sekä juurista että maaperästä tai vain juurista (Vestberg ja Timonen 2018). Pajuilta tunnistettiin myös huomattavan paljon kämmeköiden juurisieniin luokiteltuja taksoneita (17,7 %). Nämä kämmekkäsienet koostuivat toiminnaltaan monipuolisista ja muillakin kuin vain kämmeköillä löydettävistä Agaricomycetes-kantasienien *Serendipita*-suvun lajeista (Weiß ym. 2016). Osa kämmeköiden juurisienistä voi yhdistää lehtivihreättömiä kämmeköitä ja puuvartisia, mm. pajuja ja koivuja, toisiinsa yhteisellä rihmastolla, jolloin kämmekkä voi käyttää energianlähteenä puuvartisen yhteyttämää hiiltä (mm. McKendrick ym. 2000; 2002). *Serenpiditaceae*-heimoon kuuluvia sieniä on löydetty mm. verkkolehtipajun (*Salix reticulata*) juurista Pohjois-Ruotsista (Ryberg ym. 2009).

4.2 Pajulajikkeiden väliset erot juurten mikrobiyhteisöissä

Kasvatuskokeissa pajulajikkeilla on ilmennyt suuria eroja muun muassa biomassan tuotossa, talvenkestävyydessä ja tautiresistenssissä (mm. Pohjonen 2015). Pajukosteikolle valituista lajikkeista Gudrun, Karin ja Klara ovat aiempien tutkimusten perusteella pohjoisessa hyvin menestyneitä lajikkeita kasvultaan ja kestävyydeltään (Pohjonen 2015). Lajikkeen perimän

ohella kasvin kasvuun ja selviytymiseen ympäristössä voi vaikuttaa kyky muodostaa vuorovaikutuksia mikrobien kanssa (Van der Heijden 2001; Hayat ym. 2010). Tässä tutkimuksessa bakteeriyhteisöjen lajirikkaus, samankaltaisuus ja monimuotoisuus olivat suurempia Gudrun-lajikkeella kuin Karinilla ja Klaralla. Erityisesti bakteeriyhteisöjen samankaltaisuus oli paikallisella Torangin maatiaislajikkeella lähimpänä Gudrun-lajikkeen arvoja, mikä voi viitata Gudrunilla kykyyn sopeutua muodostamalla uuden ympäristön vaatimusten mukaisia mikrobivuorovaikutuksia. Karinin ja Klaran bakteeriyhteisöjen diversiteetti-indeksien arvot olivat lähellä toisiaan ja pääosin poikkesivat muiden lajikkeiden arvoista, mitä voi osaltaan selittää lajikkeilta löytyvät yhteiset venäläiset kantamuodot (Pohjonen 2015). Toisin kuin bakteereilla, sieniyhteisöjen diversiteetti-indeksien arvot eivät eronneet pajulajikkeiden välillä ja yksittäisiä merkitsevästi eroavia sienitaksoneitakin oli vain muutamia. Sienillä tämä ei ole niin yllättävää, sillä osalla sienitaksoneista voi olla todella laaja isäntäkasvivalikoima ja ne ovat mahdollisesti vaativampia maaperän kuin isäntälajin ominaisuuksille, esimerkkinä keräsienet (Vestberg ja Timonen 2018; Bonito ym. 2014).

4.3 Puhdistuskosteikon ravinteisuuden ja kosteuden vaikutus juurten mikrobiyhteisöön

Pajuilla bakteeri- ja sieniyhteisöjen diversiteetti-indeksien arvoissa ei havaittu selkeitä eroja pajukosteikon ja kontrollialueen välillä. Pajulajikkeiden välillä havaittujen mikrobiyhteisöjen erojen perusteella tämä ei ole sieniyhteisöjen suhteen niin yllättävää, mutta bakteeriyhteisöissä ainakin samankaltaisuuden olisi voinut odottaa eroavan koe- ja kontrollialueilla. Kuitenkin koe- ja kontrollialueiden välillä havaittiin useita merkitsevästi eroavia ainutlaatuisia taksoneita erityisesti acido-, proteo- ja aktinobakteereista, Bacteroidia-pääjaksosta, sekä sienien Agaricomycetes, Leotiomycetes, Sordariomycetes ja Dothideomycetes -luokista. Aiemmissa tutkimuksissa näistä ryhmistä on löydetty mm. useita ravinteiden, raskasmetallien tai muiden epäpuhtauksien biologiseen poistoon, sekä hiilen kiertoon yhdistettyjä mikrobilajeja ja taksoneita (Sun ym. 2010; D. Wang ym. 2019; Sim ym. 2018; Timonen ja Valkonen 2013).

Typen kierron keskeisimmät prosessit maaperässä ja kasveissa ovat typen sidonta, ammoniumtypen muuttaminen nitriiteiksi ja edelleen nitraateiksi (nitrifikaatio), sekä nitriitti/nitraattitypen vapauttaminen ilmakehään (denitrifikaatio) (Vymazal 2007). Puhdistuskosteikolla oli jäteveden vuoksi suuremmat typen pitoisuudet (kokonaistyyppi, ammoniumtyppi, nitriitti-nitraattityppi) kuin kontrollialueella. Pajuilla havaittuja typen kiertoon liittyviä bakteeriryhmiä ovat esimerkiksi alfa-proteobakteerien Rhizobiales-lahkoon

kuuluvat Beijerinckiaceae, Hyphomicrobiaceae, Devosiaceae, Rhizobiales i.s. ja Xanthobacteraceae -heimot (Borken ym. 2016; Anderson ym. 2011; Rivas ym. 2002; Jia ym. 2019; Sawada ym. 2003). Beijerinckiaceae- ja Hyphomicrobiaceae-ryhmiä tavattiin pajuilla enemmän kontrollialueella, kun taas Devosiaceae- ja Rhizobiales i.s. -ryhmiä, sekä Xanthobacteraceae-heimon *Bradyrhizobium*-sukua havaittiin runsaammin koealueella. Erityisesti kontrollialueella esille nousseen Rhizobiales-lahkon suurimman typenkiertoon yhdistetyn ryhmän Beijerinckiaceae lajien tiedetään olevan maaperässä vapaana eläviä bakteereita, jotka sitovat ilmakehän typpeä kasveille käyttökelpoiseen muotoon esimerkiksi ammoniakiksi (Borken ym. 2016; Shin ym. 2016). Pajuilla havaittujen typen kiertoon liittyvien bakteeritaksonien pääpaino on mahdollisesti runsaasti typpeä sisältävällä puhdistuskosteikolla denitrifikaatiossa ja kontrollialueella taas typen sidonnassa. Huja-raportissa (Postila ym. 2018) arvioitiin, että typen puhdistukseen koealueella ovat mahdollisesti vaikuttaneet maaperän nitrifikaatio-denitrifikaatioprosessit, sillä typpeä puhdistui enemmän kuin sitä pidättyi pajujen biomassaan. Kokonaisuudessaan alfabroteobakteereita ja Rhizobiales-ryhmää havaittiinkin enemmän kontrollialueella ja erityisesti Gudrun ja Klara -lajikkeilla. Torangin maataisella Devosiaceae-ryhmän runsaus oli sitä suurempaa, mitä suurempi oli biomassa ja ryhmässä voisi olla pajun kasvua edistäviä taksoniteita. Myös pajuilla koealueella runsaampana havaituista Planctomycetes- ja Nitrospirae-pääjaksoista tiedetään löytyvän typen kiertoon osallistuvia nitrifikaatiobakteereita (Lücker ym. 2010). Näistä Nitrospirae-ryhmällä havaittiin heikko korrelaatio biomassan kanssa eli ryhmän runsaus kasvoi pajujen biomassan kasvaessa. Mahdollisesti Nitrospirae-ryhmän lajeilla voisikin olla pajujen kasvua edistävää vaikutusta, mutta tästä ei ollut tarkempaa tutkimusta löydettävissä.

Pajuilla havaittiin runsaasti aktinobakteereita ja tiedetään, että typen lisäys voi nostaa ryhmän runsautta. Aktinobakteerit on myös yhdistetty fytoimediaatiossa kasvin parempaan toleranssiin kuparille, kuparin ottoon maanpäällisiin osiin, sekä kasvin juurien ja maanpäällisten osien kuivapainon nousuun rapsilla (*Brassica napus*) (Sun ym. 2010). Aktinobakteereilla havaittiin olevan käsittelyiden välillä eroavia ryhmiä, mutta ne olivat mahdollisesti joitain pieniä (< 0,01 %), tilastollisen tarkastelun ulkopuolelle jääneitä ryhmiä. Gudrunilta ja Torangin maataiselta löytyi runsaimmin Acidobakteereita, joista erityisesti ”kandidaattiluokka 6” -alaryhmää havaittiin enemmän koealueella ja Acidobacteria-ryhmää kontrollialueella. Lisätyppeä ja ravinteita koealueella saaneella ”kandidaattiluokalla 6” onkin aiemmissa tutkimuksissa havaittu yhteyttä maaperän orgaanisen hiilen ja kokonaistypen runsauteen (Li ym. 2017). Kontrollialueella ”kandidaattiluokan 6” runsaus oli lisäksi sitä suurempaa, mitä suurempi oli pajun biomassa eli ryhmän lajeilla voisi olla kasvin kasvua

edistävää vaikutusta. Acidobacteriia-ryhmän runsautta taas voi lisätä pitkän aikavälin lannoitus ja kalkitus (Ma ym. 2018), mutta pajuilla lisäravinteita saaneella koealueella ryhmän suhteellinen runsaus oli alhaisempi kuin puhtaalla kontrollialueella. Acidobacteriia-ryhmästä ei löydy paljoa tutkimusta, emmekä tiedä mikä vaikuttaa ryhmän runsauteen kontrollialueella. Toisaalta joissain tutkimuksissa acidobakteerien suhteellisen runsauden ja lajirikkauden on havaittu vähenevän maaperässä typen lisäyksen seurauksena (Zhang ym. 2013) ja voi olla että esimerkiksi typpi vaikuttaa Acidobacteriia-alaryhmän runsauteen vähentävästi. Kontrollialueella havaittiin runsaammin myös Armatimonadetes-bakteeriryhmää, jonka runsauden tiedetään myös voivan laskea typen lisäyksen seurauksena (Du ym. 2019).

Gemmatimonadetes ja patescibakteerit -ryhmien suhteellinen runsaus oli suurinta Gudrunilla ja Torangin maatiAISella. Koealueella parhaiten selviytyneellä Gudrunilla ja pohjoisen olosuhteisiin sopeutuneella paikallisella Torangin maatiAISella patescibakteerit voisivat liittyä esimerkiksi talvenkestävyyteen, sillä ryhmästä on havaittu suurta monimuotoisuutta esimerkiksi ikijäätiköillä (Frey ym. 2016). Gemmatimonadetes-ryhmän suhteellinen runsaus taas on muissa tutkimuksissa yhdistetty typen lisäykseen maaperään (Zhang ym. 2013). Pajuilla Gemmatimonadetes-ryhmää havaittiin kuitenkin runsaammin kontrollialueella, kuin lisäveden mukana typpeä ja muita ravinteita saaneella koealueella. Gemmatimonadetes-ryhmän bakteerien runsauden havaittiin myös kasvavan kontrollialueella pajujen biomassan kasvaessa ja ryhmän lajeilla voisikin olla merkitystä pajujen kasvun edistämisessä. Lisäveden tuoma kosteus koealueella ja toisaalta kontrollialueen sateista riippuvainen kuivuus ovat myös voineet vaikuttaneet mikrobiyhteisöön. Maaperän märkyys ja siihen liittyvä happipitoisuuden väheneminen voivat olla ainakin maaperäsienille haitallista (Vestberg ja Timonen 2018). Bakteeriryhmistä gemmatimonadetes yhdessä Chloroflexin kanssa on yhdistetty puuvillan (*Gossypium hirsutum* L.) ritsosfäärissä termofiiliseksi, kuivissa olosuhteissa hyvin menestyviksi mädättäjäbakteereita sisältäviksi ryhmiksi (Ullah ym. 2019). Näyttäisikin, että pajuilla Gemmatimonadetes-ryhmä ei pidä lisävedestä, vaikka saisi sen mukana lisätyppeä, vaan menestyy paremmin kuivemmalla kontrollialueella. Chloroflexi-ryhmä taas ei ollut pajuilla Gemmatimonadetes-ryhmän tavoin herkkä kosteudelle, vaan menestyi paremmin koealueella hyötyen todennäköisesti lisäveden mukana tulleista ravinteista.

4.4 Raskasmetallien ja orgaanisten epäpuhtauksien poistoon liittyvät mikrobit

Puhdistuskosteikoilla raskasmetallien ja epäpuhtauksien hajottamiseen ja poistoon kykenevät ryhmät ovat merkityksellisiä kosteikon toiminnalle. Jäteveden mukana puhdistuskosteikolle on tullut mm. raskasmetalleista kadmiumia (Cd), kromia (Cr), kuparia (Cu), elohopeaa (Hg), nikkeliä (Ni), lyijyä (Pb), uraania (U) ja sinkkiä (Zn) (Postila ym. 2018). Mahdollisia jätevedessä olleita orgaanisia epäpuhtauksia ja niiden määriä ei Torangin puhdistuskosteikolla mitattu, mutta on todennäköistä että niitä on ollut jonkin verran. Erään arvion mukaan jätevedenpuhdistamoille tulevista orgaanisista epäpuhtauksista noin 14 % jää edelleen lähteviin jätevesiin (Vieno 2014), mitä kosteikollekin syötettiin. Torangin puhdistuskosteikolle yhdyskuntajätevesien mukana mahdollisesti tulleista bakteereista ainakaan enterobakteereita (Enterobacteraceae) ja niihin kuuluvia veden puhtauden indikaattorilajeina pidettäviä ihmisperäisiä kolibakteereita (*Escherichia coli*) (Edberg ym. 2000) ei havaittu pajujen mikrobiyhteisöissä. Jäteveden mahdollisesti sisältämiä mikrobeita ei kuitenkaan ole tutkittu puhdistuskosteikolle syötettävästä vedestä (Heini Postila, suullinen tiedonanto). Mikäli mikrobeita tuli puhdistuskosteikolla, on kosteikko joko puhdistanut niitä, tai mikrobit ovat peseytyneet pois juurien pinnasta näytteiden esikäsittelyn aikana.

Pajuilla koealueella runsaammasta Chloroflexi-ryhmästä on tunnistettu esimerkiksi myrkyllistä bifenyylimuokautettua alentavia maaperäbakteereita (mm. Bedard 2008; Correa ym. 2010) ja mm. Chloroflexales-alaryhmä on yhdistetty ympäristölle myrkyllisten fenolien hajottamiseen, mitkä voivat toimia mikrobeille hiilen lähteenä (Sánchez-González ym. 2019). Chloroflexi-ryhmän taksonilla on voinut olla pajujen kasvua edistävää vaikutusta ja Torangin maataisella havaittujen Chloroflexin alaryhmien runsaus kasvoikin pajujen biomassan kasvaessa. Chloroflexi-pääjaksoa ja erityisesti sen suurimpia Chloroflexales- ja Roseiflexaceae-alaryhmiä, sekä gammaproteobakteerien Betaproteobacteriales-lahkoa havaittiin lajikkeista eniten Karinilla. Nämä mikrobiryhmät tukevat käsitystä Karinin soveltuvuudesta bioremediaatioon. Betaproteobacteriales-ryhmää näyttäisi myös olevan runsaammin koealueella ja ryhmän Burkholderiaceae-heimosta on tunnistettu tehokkaimpiin kuuluvat kloorifenolihdisteitä (PCB) hajottavat bakteerit (*Burkholderia xenovorans* ja *Ralstonia eutropha*) (Passatore ym. 2014), sekä löydetty esimerkiksi kasvua parantava bakteerilaji poppelligilla (van der Lelie ym. 2009). Lisäksi Klaralla ja Karinilla runsaana havaittavan Burkholderiaceae-ryhmän *Rhodofera*-suvun on todettu olevan merkittävä ravinteiden kiertämisessä ja kasvin kasvun parantamisessa (Inceoglu ym. 2010) ja *Rhodofera*-suvusta on myös

havaittu typen denitrifikaatioon osallistuvia bakteerilajeja jäteveden käsittelykasveilla (McIlroy ym. 2016)

Muita koealueella runsaampana havaittuja merkittäviä epäpuhtauksien hajottamiseen mahdollisesti liittyviä mikrobitalksoneita löytyy ainakin Bacteroidetes-pääjaksosta ja proteobakteerien Sphingomonadales- ja Xanthomonadaceae-ryhmistä. Bacteroidetes ryhmästä tiedetään esimerkiksi endofyyttinen bakteerilaji, joka mahdollisesti toimii hyönteismyrkkinä käytetyn avermectin-aineen hajottamisessa (Li ym. 2008). Sphingomonadales-lahko on yhdistetty PCP-yhdisteiden hajottamiseen (Nohynek ym. 1996) ja ryhmästä löytyy tiedetysti myös polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH) hajottavia bakteereita. Myös Xanthomonadaceae-heimosta tiedetään ainakin yksi tällainen PAH-aineita hajottava bakteerilaji (*Luteimonas*) (Bacosa ja Inoue 2015) ja molemmista Xanthomonadaceae- ja Sphingomonadales-ryhmistä on myös havaittu lajeja, jotka kykenevät diesel-polttoaineen hajotukseen (Farber ym. 2019). Mitään pajuilla löydetystä taksonomisista sieniryhmistä ei havaittu jätevetä saaneella koealueella runsaampina, vaikka esimerkiksi Sordariomycetes ja Dothideomycetes -sieniryhmistä on muissa tutkimuksissa havaittu endofyyttisiä metalleja sietäviä sienilajeja fytoimediaatioon käytetyn järviruo'on (*Phragmites*) lehdistä (Sim ym. 2018). Monet Sordariomycetes-ryhmän lajit (*Trichoderma*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Cunninghamella*) voivat myös hajottaa maaperän orgaanisia epäpuhtauksia kuten PAH-aineita (Assress ym. 2019; Marchand ym. 2017). Näistä *Trichodermaa* ja *Fusariumia* löytyi pajuilla kuitenkin vain muutamia sekvenssejä kontrollialueelta.

4.5 Pajujen versobiomassan suhde juurten mikrobiyhteisöihin

Puhdistuskosteikolla kasvaneiden pajujen yhteenlasketut versobiomassat olivat selvästi suurempia kuin kontrollialueilla kasvaneiden. Yksittäisistä pajulajikkeista vain Gudrunin näytteiden biomassat olivat keskimäärin suurempia kuin Torangin maataisen. Korkean biomassan pajuilla runsaina havaitut mikrobiryhmät ovat paitsi puhdistuskosteikolla, mahdollisesti myös Gudrunilla runsaina ilmeneviä ryhmiä ja biomassan laskiessa runsaana havaitut mikrobiryhmät taas voivat olla kontrollialueen lisäksi Torangin maataiselle ominaisia mikrobiryhmiä. Pajuilla havaitut mikrobiryhmien positiiviset korrelaatiot biomassan kanssa voivat siis viitata pajulajikkeiden mikrobistojen eroihin, mutta toisaalta parhaiten kasvaneiden pajulajikkeiden mikrobiyhteisöissä todennäköisesti on enemmän kasvin kasvua tukevia mikrobivuorovaikutussuhteita, kuin huonommin kasvaneilla pajulajikkeilla.

Pajujen biomassan kasvaessa latecibakteerien ja Gudrunilla Pezizaceae-sieniheimon sekä FCPU426-bakteeripääjakson suhteelliset runsaudet kasvoivat. Gudrunilla Pezizaceae-ryhmän sieniä havaittiin runsaimmin pajujen biomassan kasvaessa erityisesti koealueella ja ryhmää tiedetään havaittavan yleisesti ns. häirityissä ympäristöissä (Gehring ym. 1998; Saravesi ym. 2015), joten Pezizaceae-sienitaksonit ovat mahdollisesti olleet edistämässä pajujen kasvua puhdistuskosteikolla. Latecibakteereita näytti olevan runsaimmin Gudrunilla ja Klaralla eli suurimman biomassan lajikkeilla. Korkeiden biomassojen pajuilla havaittiin keskenään hieman samankaltaisemmat bakteeriyhteisöt kuin matalan biomassan pajuilla. Tämän pohjalta tietentyypisten mikrobiyhteisöjen voisi tulkita tukevan pajujen kasvua parhaiten, mutta toisaalta isojen pajujen bakteeriyhteisöjen samankaltaisuus on todennäköisesti seurausta suuremman juuriston runsaammasta hiilen määrästä, mikä hyödyttää osaa mikrobiryhmistä enemmän kuin toisia (Hryniewicz ym. 2010).

4.6 Aineiston luotettavuus

Tutkimuksen tekoon liittyy aina omat epävarmuustekijänsä. Torangin tutkimusalueella pajukosteikolle johdettiin moninkertainen vesimäärä verrattuna kontrollialueelle tulevaan sadantaan, mikä yhdessä jäteveden sisältämien ravinteiden kanssa on voinut edesauttaa pajujen kasvua. Kontrollialueelta puuttui pajukosteikolla ollut eläimiltä suojaava aita, sinne ei tehty rikkakasvien poistotoimenpiteitä, eikä maaperä saanut osakseen yhtä perusteellista muokkausta kuin koealueella, jossa poistettiin lisäksi suurimmat kivet maa-aineksen joukosta. Nämä kaikki tekijät ovat voineet vaikuttaa osaltaan kontrollialueen pajunäytteiden heikompaan kasvuun ja selviytymiseen.

Puhdistuskosteikolla laitimaisten pajujen kasvuun on voinut vaikuttaa maaperästä HPDE-kalvolla eristämisen aiheuttama ns. reunaefekti rajoittaen mahdollisesti juurten käytössä ollutta maatilaa. Kosteikolla tehtiin mekaanista rikkakasvien poistoa, mutta koe- ja kontrollialueilla kemiallinen rikkakasvien poisto ennen pistokkaiden istutusta olisi tukenut pistokkaiden kasvuun lähtöä paremmin. Lyhyen aikataulun vuoksi sitä ei ehditty tehdä, sillä se olisi vaatinut varoajan ennen pajupistokkaiden istutusta. Nyt pistokkaat joutuivat kilpailemaan jossain määrin muiden kasvien kanssa, ja tämä on voinut vaikuttaa erityisesti hennoimpien Torangin maatiaisen pistokkaiden selviytymiseen kontrollialueella.

Lisäksi näytteiden käsittelyssä ennen DNA:n eristystä (juurten sulatus, puhdistus ja näytejuurien valinta) oli mukana useampia henkilöitä, mikä on voinut vaikuttaa näytteiden samankaltaisuuteen. Erityisesti juurten puhdistus vedellä mullasta on voinut vaikuttaa juuren

ulkopuolisten symbionttien eli ektosfäärimikrobien määrään näytteissä. Myös pajujen juuriston koko vaihteli, juuristoa pääjuuresta irrotettaessa kaikissa näytteissä ei ollut riittävästi hienoa juurta, vaan osaan näytteistä tuli väistämättä hieman enemmän vahvempaa juuristoa.

Tutkimustulosten selkeyden kannalta mahdollisimman suuri näytemäärä olisi ihanteellinen. Pajunäytteiden lukumäärä oli alhainen erityisesti kontrollialueen pajulajikkeilla ja osa (lm)testeistä jätettiin sen vuoksi huomiotta. Myös NMDS-ordinaatioista olisi voinut isommalla aineistolla saada selkeämpiä tuloksia ja esimerkiksi ANCOM-analyysinkin herkkyyys on pienissä aineistoissa (<20 näytettä ryhmä) alentunut (Weiss ym. 2017).

4.7 Ehdotuksia jatkotutkimukseen

Tutkimuksen pajujen puhdistuskosteikko oli toiminnassa kaksi kasvukautta. Pajujen kasvu nuoruusvaiheen yli ja ”toimivimman” mikrobiston vakiintuminen voi viedä pitkän aikaa ja toisaalta tulevan jäteveden laadussa voi olla vaihtelua vuosien välillä. Tutkimuksen pajuja ei harvennettu ennen mikrobistoselvitystä ja eri pajulajikkeilla voi olla erilaisia vasteita harvennukseen, joka vaikuttaa juuristomikrobeihin laidunnuksen lailla lehvästön vähenemisen kautta. Kosteikkopajujen eri ikäkaaren vaiheiden tarkastelu voisikin antaa lisätietoa eri lajikkeiden mikrobistojen muutoksesta ja toimintakyvystä kosteikon perustamisvaiheessa, ensimmäisten käyttöönottovuosien ja harvennusten aikana, sekä myöhemmissä vaiheissa valottaen optimaalista ikävaihetta, jolloin kosteikkopajujen toimintakyvyn lasku vaatii joko koko kosteikon (maa-alueineen) tai puhdistukseen käytettyjen pajujen uudistamisen. Yhdisteet, joita biopajut eivät mahdollisesti kykene hajottamaan/ottamaan, voivat kertyä maaperään kosteikkopajujen toimintaa pitkällä aikavälillä haitaten. Maaperällä on muutenkin suuri vaikutus kasvien kasvuun ja mikrobiyhteisöjen muodostumiseen. Kaikki remediaatiokasvit eivät toimi kaikissa ympäristöissä, mutta mahdollisesti maaperä-, jätevesityyppi- ja puhdistuskasvikohtaisesti optimoidut mikrobikäsittelyt, voisivat tulevaisuudessa antaa vahvaa tukea kosteikkolajikkeiden toiminnalle. Pajuilta löytyvien mikrobitalaksonien tutkimisen lisäksi puhdistuskosteikoilla voitaisiinkin selvittää yhä tarkemmin havaittujen mikrobitalaksonien toiminnallista merkitystä ravinteiden, raskasmetallien ja muiden haitallisten aineiden poistamisessa ja hajottamisessa.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Pajujen juurten mikrobiyhteisön selvitystyö vahvisti tutkituilla pajulajikkeilla olevan monia sellaisia mikrobiryhmiä, joilla on myös aiemmissa tutkimuksissa havaittu merkittävää yhteyttä biopuhdistukseen. Useat pajuilla koealueella runsaampana havaitut taksonomiset ryhmät liittyivät epäpuhtauksien, kuten fenolien tai PCB-aineiden hajottamiseen, ravinteiden kiertoon/ottoon tai poistamiseen maaperästä, sekä kasvien parempaan kasvuun. Kontrollialueella runsaampana havaitut taksonit liittyivät esimerkiksi kuivuuden sietoon, orgaanisen aineen hajottamiseen tai ravinteiden, kuten typen kiertoon.

Pajulajikkeista Gudrunin bakteeriyhteisö poikkesi merkittävästi Karinin ja Klaran bakteeriyhteisöjä monipuolisempana useiden diversiteetti-indeksi-arvojen suhteen. Sieniyhteisöistä havaittiin vain yksittäisiä tilastollisesti merkitsevästi poikkeavia taksoneita. Torangin maatiaisella monet muita lajikkeita runsaampana havaitut taksonomiset ryhmät olivat yhteisiä Gudrun lajikkeen kanssa ja mahdollisesti liittyivät pajujen parempaan selviytymiseen pohjoisissa olosuhteissa ja koealueen kaltaisessa maaperässä. Gudrunin ja Torangin maatiaisen bakteeriyhteisöjen samankaltaisuus voisikin kertoa Gudrun-lajikkeen hyvästä sopeutumiskyvystä uuteen kasvuympäristöön. Samansukuisten Klaran ja Karinin mikrobistoissa taas oli molemmilla runsaasti orgaanisen aineksen hajotukseen osallistuvia mikrobiryhmiä. Näistä Klara oli bakteeriyhteisöltään hieman lähempänä Gudrunia sisältäen Karinia enemmän mm. typen kiertoon yhdistettyjä bakteeritaksoneita.

Lajikkeista Gudrun, Karin ja Klara ovat jalostettuja ja useiden tutkimusten parhaimmiston kuuluneita lajikkeita kasvultaan ja talvenkestävyydeltään, Gudrun yhtenä parhaimmista. Pajukosteikolta saatujen tulosten perusteella tässäkin tutkimuksessa parhaiten kasvultaan ja selviytymiseltään menestynyt Gudrun olisikin selkeästi suositeltavin biopuhdistukseen, vaikka myös Karin ja Klara -lajikkeet voivat toimia hyvin. Torangin maatiaisen bakteeriyhteisön lajirikkaus, monimuotoisuus ja samankaltaisuus vaikuttivat myös lupaavilta ollen jopa parempia kuin Karinilla, mutta lajikkeen biomassan tuotto ja selviytymisprosentti jäivät tässä tutkimuksessa todella heikoiksi. Tähän on oletettavasti vaikuttanut pistokkaiden pienempi koko ja lajike voi myös olla luonnostaan kasvultaan alempaa. Lisäksi, vaikka Torangin maatiaisella oli paikallisena lajikkeena ”kotikenttäetu” symbionttisten mikrobisuhteiden muodostamisessa, ei monipuolinen ja lajirikas mikrobiyhteisö yksistään takaa lajikkeen menestymistä kasvatusolosuhteissa.

KIITOKSET

Isot kiitokset pro gradu -työni ohjaajille: Saija Ahonen (Luonnontieteellinen tiedekunta, Ekologian ja genetiikan yksikkö), Annamari Markkola (Ekologian ja genetiikan yksikkö) ja Heini Postila (Vesi-, Energia- ja ympäristötekniikan tutkimusyksikkö) Oulun yliopistosta. Saija Ahoselle erityiskiitos molekyyllaboratorio-osuudesta (PCR) ja bioinformatiikasta (QIIME2), pitkäjänteisestä ja kärsivällisestä ohjauksesta, sekä kannustavista ja opettavista kommentista työn eri vaiheissa. Kiitos sekvenssoinnista Marko Suokas (Oulun Biocenter) ja iso kiitos kaikille heille, jotka ovat Oulun yliopiston puolelta työssä avustaneet. Kiitän näytteiden purkamisessa avustaneita opiskelijoita Veera Saari, Elli Närhi ja Serena Baini Oulun yliopistolta.

Pro gradu -työssä on hyödynnetty Euroopan aluekehitysrahaston (EAKR) osittain rahoittamassa Metallipitoisten hulevesien ja käsiteltyjen jätevesien puhdistustehokkuuden parantaminen luonnonmateriaaleilla (HuJa) -projektissa kerättyä aineistoa. Haluan kiittää kaikkia projektiin osallistuneita ja projektia rahoittaneita tahoja. Viimeisenä vielä iso kiitos Suomen Biologian Seura Vanamolle ja Maa- ja vesitekniikan tuki ry:lle kannustavista apurahoista pro gradu -työn toteuttamiseen.

KIRJALLISUUS

- Afzal, M., Q.M. Khan, ja A. Sessitsch. 2014. "Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants". *Chemosphere* 117 (1): 232–42. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.078>.
- Alberts, B, toim. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland. <http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip0710/2007005476.html>.
- Anderson, C R, L M Condron, T J Clough, M Fiers, A Stewart, R A Hill, ja R R Sherlock. 2011. "Biochar Induced Soil Microbial Community Change: Implications for Biogeochemical Cycling of Carbon, Nitrogen and Phosphorus". *Pedobiologia* 54 (5–6): 309–20. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.07.005>.
- Assress, H A, R Selvarajan, H Nyoni, K Ntushelo, B B Mamba, ja T A M Msagati. 2019. "Diversity, Co-Occurrence and Implications of Fungal Communities in Wastewater Treatment Plants". *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50624-z>.
- Bacosa, H P, ja C Inoue. 2015. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Biodegradation Potential and Diversity of Microbial Consortia Enriched from Tsunami Sediments in Miyagi, Japan". *Journal of Hazardous Materials* 283: 689–97. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.068>.
- Bedard, D. L. 2008. *A case study for microbial biodegradation: Anaerobic bacterial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls - From sediment to defined medium*. *Annual Review of Microbiology*. Vsk. 62. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162733>.
- Begerow, D, H Nilsson, M Unterseher, ja W Maier. 2010. "Current State and Perspectives of Fungal DNA Barcoding and Rapid Identification Procedures". *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (1): 99–108. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>.
- Besser, J, H A Carleton, P Gerner-Smidt, R L Lindsey, ja E Trees. 2018. "Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections". *Clinical Microbiology and Infection* 24 (4): 335–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>.
- Birgmingham, A. 2018. "Microbiome Analysis with QIIME2: A Hands-On Tutorial". 2018. http://compbio.ucsd.edu/wp-content/uploads/2018/07/20180621_oslo_university_microbiome_analysis_with_qiime2_tutorial.pdf.
- Bokulich, N A, B D Kaehler, J R Rideout, M Dillon, E Bolyen, R Knight, G A Huttley, ja J G

- Caporaso. 2018. "Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifer Plugin". *Microbiome* 6 (1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>.
- Bolyen, E, J R Rideout, M R Dillon, N A Bokulich, C Abnet, G A Al-Ghalith, H Alexander, ym. 2018. "QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science". *PeerJ Preprints* 6: e27295v2. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>.
- Bonito, G, H Reynolds, M S Robeson, J Nelson, B P Hodkinson, G Tuskan, C W Schadt, ja R Vilgalys. 2014. "Plant Host and Soil Origin Influence Fungal and Bacterial Assemblages in the Roots of Woody Plants". *Molecular Ecology* 23 (13): 3356–70. <https://doi.org/10.1111/mec.12821>.
- Borken, W, M A Horn, S Geimer, N A B Aguilar, ja K-H Knorr. 2016. "Associative nitrogen fixation in nodules of the conifer *Lepidothamnus fonkii* (Podocarpaceae) inhabiting ombrotrophic bogs in southern Patagonia". *Scientific Reports* 6 (joulukuuta): 39072. <https://doi.org/10.1038/srep39072>.
- Brundrett, M C. 2009. "Mycorrhizal Associations and Other Means of Nutrition of Vascular Plants: Understanding the Global Diversity of Host Plants by Resolving Conflicting Information and Developing Reliable Means of Diagnosis". *Plant and Soil* 320 (1–2): 37–77. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>.
- Callahan, B J, P J McMurdie, ja S P Holmes. 2017. "Exact Sequence Variants Should Replace Operational Taxonomic Units in Marker-Gene Data Analysis". *ISME Journal* 11 (12): 2639–43. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>.
- Children's Research Institute. 2019. "Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease". 2019. <https://apps.sbri.org/SSGCIDTargetStatus/Pathway>.
- Correa, P.A., L. Lin, C.L. Just, D. Hu, K.C. Hornbuckle, J.L. Schnoor, ja B. Van Aken. 2010. "The effects of individual PCB congeners on the soil bacterial community structure and the abundance of biphenyl dioxygenase genes". *Environment International* 36 (8): 901–6. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.015>.
- Courty, P.-E., M Buée, A G Diedhiou, P Frey-Klett, F Le Tacon, F Rineau, M.-P. Turpault, S Uroz, ja J Garbaye. 2010. "The Role of Ectomycorrhizal Communities in Forest Ecosystem Processes: New Perspectives and Emerging Concepts". *Soil Biology and Biochemistry* 42 (5): 679–98. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.006>.
- DeLong, E F, ja N R Pace. 2001. "Environmental Diversity of Bacteria and Archaea". *Systematic Biology* 50 (4): 470–78. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0035527414&partnerID=40&md5=36a5cf5bfa01f392c43044c9ada3fa26>.

- Dimitriou, I, ja P Aronsson. 2005. "Willows for Energy and Phytoremediation in Sweden". *Unasylva* 56 (221): 47–50. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-24644509030&partnerID=40&md5=18619518f74e052a1f136851900a3037>.
- Dorne, J.L.C.M., ja J Fink-Gremmels. 2013. "Human and Animal Health Risk Assessments of Chemicals in the Food Chain: Comparative Aspects and Future Perspectives". *Toxicology and Applied Pharmacology* 270 (3): 187–95. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.013>.
- Douglas, G M, V J Maffei, J Zaneveld, S N Yurgel, J R Brown, C M Taylor, C Huttenhower, ja M G I Langille. 2019. "PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference". *bioRxiv*, tammikuuta, 672295. <https://doi.org/10.1101/672295>.
- Du, Y, T Wang, C Wang, P.-S. Anane, S Liu, ja J Paz-Ferreiro. 2019. "Nitrogen Fertilizer Is a Key Factor Affecting the Soil Chemical and Microbial Communities in a Mollisol". *Canadian Journal of Microbiology* 65 (7): 510–21. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0683>.
- Edberg, S C, E W Rice, R J Karlin, ja M J Allen. 2000. "Escherichia Coli: The Best Biological Drinking Water Indicator for Public Health Protection". *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 88 (29): 106s–116s. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034076837&partnerID=40&md5=74d7afc3f731d3b690b8f8f092265db0>.
- Farber, R, A Rosenberg, S Rozenfeld, G Benet, ja R Cahan. 2019. "Bioremediation of Artificial Diesel-Contaminated Soil Using Bacterial Consortium Immobilized to Plasma-Pretreated Wood Waste". *Microorganisms* 7 (lokakuuta): 497. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110497>.
- Fernández-Calviño, D, ja E Bååth. 2010. "Growth Response of the Bacterial Community to PH in Soils Differing in PH". *FEMS Microbiology Ecology* 73 (1): 149–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00873.x>.
- Frey, B, T Rime, M Phillips, B Stierli, I Hajdas, F Widmer, ja M Hartmann. 2016. "Microbial Diversity in European Alpine Permafrost and Active Layers". *FEMS Microbiology Ecology* 92 (3). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018>.
- Gaiero, J.R., C.A. McCall, K.A. Thompson, N.J. Day, A.S. Best, ja K.E. Dunfield. 2013. "Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion". *American Journal of Botany* 100 (9): 1738–50. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200572>.
- Gehring, C.A., T.C. Theimer, T.G. Whitham, ja P. Keim. 1998. "Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes". *Ecology* 79 (5): 1562–72. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[1562:EFCSOP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1562:EFCSOP]2.0.CO;2).

- Goodwin, S B, ja G H J Kema. 2009. "Gearing up for Comparative Genomics: Analyses of the Fungal Class Dothideomycetes: Meetings". *New Phytologist* 183 (2): 250–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02906.x>.
- Gupta, V K, I Ali, T A Saleh, A Nayak, ja S Agarwal. 2012. "Chemical Treatment Technologies for Waste-Water Recycling - An Overview". *RSC Advances* 2 (16): 6380–88. <https://doi.org/10.1039/c2ra20340e>.
- Hardoim, P R, L S Van Overbeek, G Berg, A M Pirttilä, S Compant, A Campisano, M Döring, ja A Sessitsch. 2015. "The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79 (3): 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.
- Hardoim, P R, L S van Overbeek, ja J.D.v. Elsas. 2008. "Properties of Bacterial Endophytes and Their Proposed Role in Plant Growth". *Trends in Microbiology* 16 (10): 463–71. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>.
- Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid, ja I. Ahmed. 2010. "Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review". *Annals of Microbiology* 60 (4): 579–98. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>.
- Hebert, P D N, A Cywinska, S L Ball, ja J R DeWaard. 2003. "Biological Identifications through DNA Barcodes". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270 (1512): 313–21. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Heijden, E.W. Van der. 2001. "Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*". *Mycorrhiza* 10 (4): 185–93. <https://doi.org/10.1007/s005720000077>.
- Heijden, E W Van Der, ja M Vosatka. 1999. "Mycorrhizal Associations of *Salix Repens* L. Communities in Succession of Dune Ecosystems. II. Mycorrhizal Dynamics and Interactions of Ectomycorrhizal and Arbuscular Mycorrhizal Fungi". *Canadian Journal of Botany* 77 (12): 1833–41. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0033501689&partnerID=40&md5=15b67462ba7042b21b04dfa5a586d804>.
- Heikkinen, M. 2017. *Luonnontilaisten ja ennallistettujen pienialaisten soiden soveltuvuus metsäkanalintujen poikue-elinympäristöiksi*. University of Oulu. <http://urn.fi/URN:NBN:fi:oulu-201708232759>.
- Hienonen, R. 2007. *Korroosio ja ilmastolliset vaikutukset elektroniikassa*. Toimittanut Reima Lahtinen. [2. p.]. VTT publications. Espoo: VTT.
- Hrynkiewicz, K, A Ciesielska, I Haug, ja C Baum. 2010. "Ectomycorrhiza Formation and Willow Growth Promotion as Affected by Associated Bacteria: Role of Microbial

- Metabolites and Use of C Sources". *Biology and Fertility of Soils* 46 (2): 139–50. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0419-2>.
- Ihrmark, K, I T Bödeker, K Cruz-Martinez, H Friberg, A Kubartova, J Schenck, Y Strid, ym. 2012. "New Primers to Amplify the Fungal ITS2 Region - Evaluation by 454-Sequencing of Artificial and Natural Communities". *FEMS Microbiology Ecology* 82 (3): 666–77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>.
- Inceoğlu, Ö, J F Salles, L Van Overbeek, ja J D Van Elsas. 2010. "Effects of Plant Genotype and Growth Stage on the Betaproteobacterial Communities Associated with Different Potato Cultivars in Two Fields". *Applied and Environmental Microbiology* 76 (11): 3675–84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00040-10>.
- Inderjit, ja W H van der Putten. 2010. "Impacts of Soil Microbial Communities on Exotic Plant Invasions". *Trends in Ecology and Evolution* 25 (9): 512–19. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.06.006>.
- Jia, L, B Jiang, F Huang, ja X Hu. 2019. "Nitrogen Removal Mechanism and Microbial Community Changes of Bioaugmentation Subsurface Wastewater Infiltration System". *Bioresource Technology* 294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122140>.
- Jumpponen, A. 2007. "Soil Fungal Communities underneath Willow Canopies on a Primary Successional Glacier Forefront: RDNA Sequence Results Can Be Affected by Primer Selection and Chimeric Data". *Microbial Ecology* 53 (2): 233–46. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0006-x>.
- Kadlec, Robert H, ja K R Reddy. 2001. "Temperature Effects in Treatment Wetlands". *Water Environment Research* 73 (5): 543–57. <https://doi.org/10.2175/106143001X139614>.
- Karliński, L, M Rudawska, B Kieliszewska-Rokicka, ja T Leski. 2010. "Relationship between Genotype and Soil Environment during Colonization of Poplar Roots by Mycorrhizal and Endophytic Fungi". *Mycorrhiza* 20 (5): 315–24. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0284-8>.
- Kiiski, J. 2019. *Metsälinnusto metson soidinpaikoilla: metson soveltuvuus korvikemittarilajiksi Pohjois-Suomessa*. University of Oulu. <http://jultika.oulu.fi/Record/nbnfioulu-201903151326>.
- Kivaisi, A K. 2001. "The Potential for Constructed Wetlands for Wastewater Treatment and Reuse in Developing Countries: A Review". *Ecological Engineering* 16 (4): 545–60. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00113-0).
- Koistinen, M, L Hämet-Ahti, ja W Hackman, toim. 1998. *Retkeilykasvio*. 4. täysin uud. p. Helsinki: Luonnontieteellinen keskusmuseo, kasvimuseo.

- Kokko, K. 2017. ”Tekniikan kandidaatintyö RAKENNETUT KOSTEIKOT HULEVESIEN KÄSITTELYSSÄ Lappeenrannassa 2017”. Lappeenranta: Lappeenrannan teknillinen yliopisto.
- Kuffner, M., M. Puschenreiter, G. Wieshammer, M. Gorfer, ja A. Sessitsch. 2008. ”Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows”. *Plant and Soil* 304 (1–2): 35–44. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9517-9>.
- Kumar, M S, E V Slud, K Okrah, S C Hicks, S Hannenhalli, ja H C Bravo. 2018. ”Analysis and Correction of Compositional Bias in Sparse Sequencing Count Data”. *BMC Genomics* 19 (1): 799. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5160-5>.
- Kumar, V, M Baweja, P K Singh, ja P Shukla. 2016. ”Recent Developments in Systems Biology and Metabolic Engineering of Plant–Microbe Interactions”. *Frontiers in Plant Science* 7 (September2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01421>.
- Lelie, D van der, S Taghavi, S Monchy, J Schwender, L Miller, R Ferrieri, A Rogers, ym. 2009. ”Poplar and Its Bacterial Endophytes: Coexistence and Harmony”. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28 (5): 346–58. <https://doi.org/10.1080/07352680903241204>.
- Li, F, L Chen, J Zhang, J Yin, ja S Huang. 2017. ”Bacterial Community Structure after Long-Term Organic and Inorganic Fertilization Reveals Important Associations between Soil Nutrients and Specific Taxa Involved in Nutrient Transformations”. *Frontiers in Microbiology* 8 (FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00187>.
- Li, Z, C Song, J Yang, J Guo, ja L Xing. 2008. ”Biodegradation of Avermectin by Bacteroidetes Endosymbiont Strain LYH”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (3): 361–66. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9482-8>.
- Liu, X, Z Wang, D Wang, ja J Zhang. 2016. ”Phylogeny of Populus-Salix (Salicaceae) and Their Relative Genera Using Molecular Datasets”. *Biochemical Systematics and Ecology* 68: 210–15. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.07.016>.
- Lücker, S, M Wagner, F Maixner, E Pelletier, H Koch, B Vacherie, T Rattei, ym. 2010. ”A Nitrospira Metagenome Illuminates the Physiology and Evolution of Globally Important Nitrite-Oxidizing Bacteria”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (30): 13479–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003860107>.
- Ma, B, X Lv, Y Cai, S X Chang, ja M F Dyck. 2018. ”Liming Does Not Counteract the Influence of Long-Term Fertilization on Soil Bacterial Community Structure and Its Co-Occurrence Pattern”. *Soil Biology and Biochemistry* 123: 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.003>.
- Maanmittauslaitos. 2019. ”Kansalaisen karttapaikka”. 2019.

- <https://asiointi.maanmittauslaitos.fi/karttapaiikka/>.
- Maharachchikumbura, S S N, K D Hyde, E B G Jones, E H C McKenzie, J D Bhat, M C Dayarathne, S.-K. Huang, ym. 2016. "Families of Sordariomycetes". *Fungal Diversity* 79 (1). <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0369-6>.
- Mälikönen, E, ja J Derome, toim. 2003. *Metsämaa ja sen hoito*. Helsinki: Metsälehti.
- Mandal, S, W Van Treuren, Ri A White, M Eggesbø, R Knight, ja S D Peddada. 2015. "Analysis of Composition of Microbiomes: A Novel Method for Studying Microbial Composition". *Microbial Ecology in Health and Disease* 26 (toukokuuta): 27663. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.27663>.
- Männistö, M K, M Tirola, ja M M Häggblom. 2007. "Bacterial Communities in Arctic Fjelds of Finnish Lapland Are Stable but Highly PH-Dependent". *FEMS Microbiology Ecology* 59 (2): 452–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00232.x>.
- Marchand, C, M St-Arnaud, W Hogland, T H Bell, ja M Hijri. 2017. "Petroleum Biodegradation Capacity of Bacteria and Fungi Isolated from Petroleum-Contaminated Soil". *International Biodeterioration and Biodegradation* 116: 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.030>.
- Marschner, P. 2011. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63043-9>.
- Martin, M. 2011. "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads". *EMBnet.journal; Vol 17, No 1: Next Generation Sequencing Data Analysis*. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- Martiny, J.B.H., B.J.M. Bohannan, J.H. Brown, R.K. Colwell, J.A. Fuhrman, J.L. Green, M.C. Horner-Devine, ym. 2006. "Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map". *Nature Reviews Microbiology* 4 (2): 102–12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1341>.
- Mcilroy, S J, A Starnawska, P Starnawski, A M Saunders, M Nierychlo, P H Nielsen, ja J L Nielsen. 2016. "Identification of Active Denitrifiers in Full-Scale Nutrient Removal Wastewater Treatment Systems". *Environmental Microbiology* 18 (1): 50–64. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12614>.
- McKendrick, S L, J R Leake, ja D J Read. 2000. "Symbiotic Germination and Development of Myco-Heterotrophic Plants in Nature: Transfer of Carbon from Ectomycorrhizal *Salix Repens* and *Betula Pendula* to the Orchid *Corallorhiza Trifida* through Shared Hyphal Connections". *New Phytologist* 145 (3): 539–48. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00592.x>.

- McKendrick, S L, J R Leake, D L Taylor, ja D J Read. 2002. "Symbiotic Germination and Development of the Myco-Heterotrophic Orchid *Neottia Nidus-Avis* in Nature and Its Requirement for Locally Distributed *Sebacina* Spp." *New Phytologist* 154 (1): 233–47. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00372.x>.
- Morton, J T, J Sanders, R A Quinn, D McDonald, A Gonzalez, Y Vázquez-Baeza, J A Navas-Molina, ym. 2017. "Balance Trees Reveal Microbial Niche Differentiation". Toimittanut Janet K Jansson. *mSystems* 2 (1): e00162-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00162-16>.
- Morton, J. 2016. "PROBABLE BUG BYTES: ANCOM explained". 2016. <http://mortonjt.blogspot.com/2016/06/ancom-explained.html>.
- . 2017a. "Qiime2forum: How to interpret ANCOM results". 2017. <https://forum.qiime2.org/t/how-to-interpret-ancom-results/1958/2>.
- . 2017b. "Qiime2forum: Specify W cutoff for anacom". 2017. <https://forum.qiime2.org/t/specify-w-cutoff-for-anacom/1844/9>.
- Nguyen, N H, Z Song, S T Bates, S Branco, L Tedersoo, J Menke, J S Schilling, ja P G Kennedy. 2016. "FUNGuild: An Open Annotation Tool for Parsing Fungal Community Datasets by Ecological Guild". *Fungal Ecology* 20: 241–48. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>.
- Niemi, A. 2014. "Energiapajun viljely ja käyttö vesien puhdistuksessa - teknis-taloudellinen tarkastelu".
- Nilsson, R H, K.-H. Larsson, A F S Taylor, J Bengtsson-Palme, T S Jeppesen, D Schigel, P Kennedy, ym. 2019. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications". *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D259–64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>.
- Nohynek, L J, E.-L. Nurmiaho-Lassila, E L Suhonen, H.-J. Busse, M Mohammadi, J Hantula, F Rainey, ja M S Salkinoja-Salonen. 1996. "Description of Chlorophenol-Degrading *Pseudomonas* Sp. Strains KF1(T), KF3, and NKF1 as a New Species of the Genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas Subarctica* Sp. Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (4): 1042–55. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1042>.
- Oksanen, J, F. G Blanchet, M Friendly, R Kindt, P Legendre, D McGlinn, P R. Minchin, ym. 2019. "vegan: Community Ecology Package". <https://cran.r-project.org/package=vegan>.
- Pan, K.-L., J.-F. Gao, X.-Y. Fan, D.-C. Li, ja H.-H. Dai. 2018. "The More Important Role of Archaea than Bacteria in Nitrification of Wastewater Treatment Plants in Cold Season despite Their Numerical Relationships". *Water Research* 145: 552–61.

- <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.066>.
- Passatore, L, S Rossetti, A A Juwarkar, ja A Massacci. 2014. "Phytoremediation and Bioremediation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): State of Knowledge and Research Perspectives". *Journal of Hazardous Materials* 278: 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>.
- Pennanen, T, J Liski, E Bååth, V Kitunen, J Uotila, C J Westman, ja H Fritze. 1999. "Structure of the Microbial Communities in Coniferous Forest Soils in Relation to Site Fertility and Stand Development Stage". *Microbial Ecology* 38 (2): 168–79. <https://doi.org/10.1007/s002489900161>.
- Pohjonen, V. 2015. "BIOMASSAPAJUN LAJIT JA LAJIKKEET SUOMESSA".
- Postila, H, E Heiderscheidt, T Leiviskä, P Juholin, K Iso-Junno, V Väisänen, ja S Pitkäaho. 2018. *Metallipitoisten hulevesien ja käsiteltyjen jätevesien puhdistustehokkuuden parantaminen luonnonmateriaaleilla (HuJa) Loppuraportti*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28375.52644>.
- QIIME 2 development team. 2019. "Qiime2docs: Training feature classifiers with q2-feature-classifier". 2019. <https://docs.qiime2.org/2019.7/tutorials/feature-classifier/>.
- Quail, M A, M Smith, P Coupland, T D Otto, S R Harris, T R Connor, A Bertoni, H P Swerdlow, ja Y Gu. 2012. "A Tale of Three next Generation Sequencing Platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq Sequencers". *BMC Genomics* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, ja F.O. Glöckner. 2013. "The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools". *Nucleic Acids Research* 41 (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Quince, C, A Lanzen, R J Davenport, ja P J Turnbaugh. 2011. "Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons". *BMC Bioinformatics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-38>.
- Quinn, T P, I Erb, M F Richardson, ja T M Crowley. 2018. "Understanding Sequencing Data as Compositions: An Outlook and Review". *Bioinformatics* 34 (16): 2870–78. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty175>.
- R Core Team. 2019. "R: A Language and Environment for Statistical Computing". Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Rajkumar, M, S Sandhya, M N V Prasad, ja H Freitas. 2012. "Perspectives of Plant-Associated Microbes in Heavy Metal Phytoremediation". *Biotechnology Advances* 30 (6): 1562–74. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>.

- Reinhold-Hurek, B, ja T Hurek. 2011. "Living inside Plants: Bacterial Endophytes". *Current Opinion in Plant Biology* 14 (4): 435–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>.
- Rivas, R, E Velázquez, A Willems, N Vizcaino, N S Subba-Rao, P F Mateos, M Gillis, F B Dazzo, ja E Martínez-Molina. 2002. "A New Species of *Devosia* That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume *Neptunia Natans* (L.f.) Druce". *Applied and Environmental Microbiology* 68 (11): 5217–22. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5217-5222.2002>.
- Rosenblueth, M., ja E. Martínez-Romero. 2006. "Bacterial endophytes and their interactions with hosts". *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (8): 827–37. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>.
- Ryberg, M, E Larsson, ja U Molau. 2009. "Ectomycorrhizal Diversity on *Dryas Octopetala* and *Salix Reticulata* in an Alpine Cliff Ecosystem AU - Ryberg, Martin". *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 41 (4): 506–14. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-41.4.506>.
- Salt, D E, R D Smith, ja I Raskin. 1998. "Phytoremediation". *Annual Review of Plant Biology*. AgBiotech Center, Rutgers University, New Brunswick, NJ 08903-0231, United States. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0031791424&partnerID=40&md5=78b8a3510624fd55f32c256f4f06ed1c>.
- Sánchez-González, M, H Álvarez-Urbe, R Rivera-Solís, A González-Burgos, D Escalante-Réndiz, ja R Rojas-Herrera. 2019. "Analysis of a Phenol-Adapted Microbial Community: Degradation Capacity, Taxonomy and Metabolic Description". *Journal of Applied Microbiology* 126 (3): 771–79. <https://doi.org/10.1111/jam.14166>.
- Saravesi, K., S. Aikio, P.R. Wäli, A.L. Ruotsalainen, M. Kaukonen, K. Huusko, M. Suokas, ym. 2015. "Moth Outbreaks Alter Root-Associated Fungal Communities in Subarctic Mountain Birch Forests". *Microbial Ecology* 69 (4): 788–97. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0577-8>.
- Saravesi, K, A Markkola, P Rautio, ja J Tuomi. 2011. "Simulated Mammal Browsing and Host Gender Effects on Dual Mycorrhizal *Salix Repens*". *Botany* 89 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1139/B10-081>.
- Sawada, H, L D Kuykendall, ja J M Young. 2003. "Changing Concepts in the Systematics of Bacterial Nitrogen-Fixing Legume Symbionts". *Journal of General and Applied Microbiology* 49 (3): 155–79. <https://doi.org/10.2323/jgam.49.155>.
- Schoch, C L, K A Seifert, S Huhndorf, V Robert, J L Spouge, C A Levesque, ja W Chen. 2012. "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi"; *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences* 109 (16): 6241 LP – 6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Schwarzenbach, R P, T Egli, T B Hofstetter, U Von Gunten, ja B Wehrli. 2010. "Global Water Pollution and Human Health". *Annual Review of Environment and Resources*. Institute of Biogeochemistry and Pollutant Dynamics (IBP), ETH Zrich, 8092 Zrich, Switzerland. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342>.
- Schwarzenbach, R P, B I Escher, K Fenner, T B Hofstetter, C A Johnson, U Von Gunten, ja B Wehrli. 2006. "The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems". *Science* 313 (5790): 1072–77. <https://doi.org/10.1126/science.1127291>.
- Shin, W, Md. R Islam, A Benson, M Joe, K Kim, S Gopal, S Samaddar, S Banerjee, ja T Sa. 2016. "Role of Diazotrophic Bacteria in Biological Nitrogen Fixation and Plant Growth Improvement". *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 49 (helmikuuta): 17–29. <https://doi.org/10.7745/KJSSF.2016.49.1.017>.
- Sim, C S F, Y L Cheow, S L Ng, ja A S Y Ting. 2018. "Discovering Metal-Tolerant Endophytic Fungi from the Phytoremediator Plant Phragmites". *Water, Air, and Soil Pollution* 229 (3). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3733-1>.
- Stottmeister, U, A Wießner, P Kusch, U Kappelmeyer, M Kästner, O Bederski, R A Müller, ja H Moormann. 2003. "Effects of Plants and Microorganisms in Constructed Wetlands for Wastewater Treatment". *Biotechnology Advances* 22 (1–2): 93–117. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.010>.
- Sun, L.-N., Y.-F. Zhang, L.-Y. He, Z.-J. Chen, Q.-Y. Wang, M. Qian, ja X.-F. Sheng. 2010. "Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland". *Bioresource Technology* 101 (2): 501–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.011>.
- Terävä, E. 2008. *Kasvianatomia*. Toimittanut Eira Kanervo. Helsinki: Edita.
- Timonen, S, ja J Valkonen. 2013. *Sienten biologia*. Helsinki: Gaudeamus.
- Torrentó, C, J Urmeneta, N Otero, A Soler, M Viñas, ja J Cama. 2011. "Enhanced Denitrification in Groundwater and Sediments from a Nitrate-Contaminated Aquifer after Addition of Pyrite". *Chemical Geology* 287 (1–2): 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2011.06.002>.
- Tuntematon. 2011. "Invsimpson". 2011. <https://www.mothur.org/wiki/Invsimpson>.
- Ullah, A, A Akbar, Q Luo, A H Khan, H Manghwar, M Shaban, ja X Yang. 2019. "Microbiome Diversity in Cotton Rhizosphere Under Normal and Drought Conditions". *Microbial Ecology* 77 (2): 429–39. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1260-7>.
- UNITE Community (2017): UNITE QIIME release. Version 01.12.2017. UNITE Community.

- <https://doi.org/10.15156/BIO/587481>.
- Vestberg, M, ja S Timonen. 2018. *Rihman kiertämät : kasvien ja sienten erottamaton elämä*. Toimittanut Mauritz Vestberg kirjoittaja, toimittaja ja Sari Timonen kirjoittaja, toimittaja. Vihtavuori: [Mauritz Vestberg].
- Vieno, N. 2014. ”Haitalliset aineet jätevedenpuhdistamoilla -hankkeen loppuraportti”. Helsinki.
https://www.vvy.fi/site/assets/files/1617/haitalliset_aineen_jatevedenpuhdistamoilla_hankkeen_loppuraportti.pdf.
- Vymazal, J. 2007. ”Removal of nutrients in various types of constructed wetlands”. *Science of The Total Environment* 380 (1–3): 48–65.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2006.09.014>.
- . 2010. ”Constructed Wetlands for Wastewater Treatment”. *Water (Switzerland)* 2 (3): 530–49. <https://doi.org/10.3390/w2030530>.
- . 2011a. ”Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Five Decades of Experience”. *Environmental Science and Technology* 45 (1): 61–69.
<https://doi.org/10.1021/es101403q>.
- . 2011b. ”Plants Used in Constructed Wetlands with Horizontal Subsurface Flow: A Review”. *Hydrobiologia* 674 (1): 133–56. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0738-9>.
- . 2014. ”Constructed Wetlands for Treatment of Industrial Wastewaters: A Review”. *Ecological Engineering* 73: 724–51. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.034>.
- Wang, D, T Li, K Huang, X He, ja X.-X. Zhang. 2019. ”Roles and Correlations of Functional Bacteria and Genes in the Start-up of Simultaneous Anammox and Denitrification System for Enhanced Nitrogen Removal”. *Science of the Total Environment* 655: 1355–63.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.321>.
- Wang, R, Y Hu, Y Wang, S Ali, Q Liu, ja S Guo. 2019. ”Nitrogen Application Increases Soil Respiration but Decreases Temperature Sensitivity: Combined Effects of Crop and Soil Properties in a Semiarid Agroecosystem”. *Geoderma* 353: 320–30.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.07.019>.
- Weiβ, M, F Waller, A Zuccaro, ja M.-A. Selosse. 2016. ”Sebacinales - One Thousand and One Interactions with Land Plants”. *New Phytologist* 211 (1): 20–40.
<https://doi.org/10.1111/nph.13977>.
- Weiss, S, Z Z Xu, S Peddada, A Amir, K Bittinger, A Gonzalez, C Lozupone, ym. 2017. ”Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics”. *Microbiome* 5 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>.

- Welch, R M. 1995. "Micronutrient Nutrition of Plants". *Critical Reviews in Plant Sciences* 14 (1): 49–82. <https://doi.org/10.1080/07352689509701922>.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, J. W. Taylor, M. A. Innis, D. H. Gelfand, ja J. Sninsky. 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics". Teoksessa *Pcr Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 31:315–22.
- Wickham, H. 2007. "Reshaping data with the reshape package". *Journal of Statistical Software*, 21(12). <http://www.jstatsoft.org/v21/i12/paper>.
- . 2016. "ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis". Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Woese, C R, ja G E Fox. 1977. "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (11): 5088 LP – 5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>.
- Wu, B, M Hussain, W Zhang, M Stadler, X Liu, ja M Xiang. 2019. "Current Insights into Fungal Species Diversity and Perspective on Naming the Environmental DNA Sequences of Fungi". *Mycology* 10 (3): 127–40. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1614106>.
- Yang, C.-H., ja D.E. Crowley. 2000. "Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status". *Applied and Environmental Microbiology* 66 (1): 345–51. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.345-351.2000>.
- Yang, C.-H., D E Crowley, ja J A Menge. 2001. "16S RDNA Fingerprinting of Rhizosphere Bacterial Communities Associated with Healthy and Phytophthora Infected Avocado Roots". *FEMS Microbiology Ecology* 35 (2): 129–36. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00120-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00120-3).
- Yang, T, Y Chen, X.-X. Wang, ja C.-C. Dai. 2013. "Plant Symbionts: Keys to the Phytosphere". *Symbiosis* 59 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0190-2>.
- Yergeau, E, J Tremblay, S Joly, M Labrecque, C Maynard, F E Pitre, M St-Arnaud, ja C W Greer. 2018. "Soil Contamination Alters the Willow Root and Rhizosphere Metatranscriptome and the Root-Rhizosphere Interactome". *ISME Journal* 12 (3): 869–84. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0018-4>.
- Zhang, X., Q. Chen, ja X. Han. 2013. "Soil bacterial communities respond to mowing and nutrient addition in a steppe ecosystem". *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084210>.

LIITTEET

Kuvat ja taulukot

Taulukko L1. Sienien PCR reaktioliuoksen koostumus

Templaatti-DNA (5 ng/μl)	1,5 μl
Etu-aluke (fITS7b*) (2 μM)	1,5 μl
Taka-aluke (ITS4-barcode*) (2 μM)	1,5 μl
dNTP (10 mM)	0,3 μl
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase DNA-polymeraasi (2U/μl)	0,15 μl
5 × Phusion HF Buffer reaktiopuskuri	3 μl
H₂O (ster. vesi)	7,05 μl
Tilavuus yhteensä	15 μl

*Ion Torrent adapteri mukana

Taulukko L2. Bakteerien PCR reaktioliuoksen koostumus

Templaatti-DNA (5 ng/ μl)	1,5 μl
Etu-aluke (519FM-barcode*) (5 μM)	0,6 μl
Taka-aluke (926rP1*) (2 μM)	1,5 μl
dNTP (10 mM)	0,3 μl
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase DNA-polymeraasi (2U/μl)	0,15 μl
5 × Phusion GC Buffer reaktiopuskuri	3 μl
DMSO (100 %)	0,45 μl
H₂O (ster. vesi)	7,5 μl
Tilavuus yhteensä	15 μl

*Ion Torrent adapteri mukana

Taulukko L3. Mikrobisekvenssien näytekohteiset lukumäärät QIIME2-prosessin eri vaiheissa.

	BAKTEERIT			SIENET		
	Viivakoodi erottelu	DADA2	kloro- /mitoDNA poisto	Viivakoodi erottelu	DADA2	alle 100 emäsparia poisto
Näyte/yht.	1170118	977361	527717	480163	261680	211877
G12	42080	34825	22790	37804	13533	12891
G28	48027	39163	25867	21346	10786	8260
G3	31691	27169	14948	20559	13689	12939
G36	58646	47518	36654	23562	15758	15758
G44	69995	57939	42205	16836	8655	6657
GR10	48598	40416	28467	15726	10171	10144
GR12	55309	43162	32220	21818	11943	11891
GR15	43138	36274	22011	19375	9350	7225
GR17	38123	31065	17852	14127	9317	101
GR9	35261	29412	16223	14723	7135	5125
Ka21	44804	35200	21193	17089	10568	3187
Ka29	39455	33061	17752	16239	10614	3135
Ka4	29461	24537	6869	21	11	11
Ka45	39097	30808	14169	14977	8931	1408
Ka8	26586	23679	3812	16914	8630	7647
KaaRe1	43813	34405	20719	14837	6382	5621
KL11	33171	28376	11944	9286	5617	5617
KL19	28087	24817	5909	16824	10413	10391
KL31	23962	21108	9171	14815	7945	7130
KL39	32927	28980	6950	15935	9462	8670
KL6	32659	29088	10424	12	7	7
KIR2	34879	30199	15007	13211	7916	7822
KIR5	34612	29412	15104	164	96	96
KIR7	33833	27875	13611	16027	8689	7290
TM3.18	23340	20230	8822	13805	6836	6836
TM30	32614	28495	9859	23377	13008	12958
TM38	48033	39363	24509	15338	7757	7757
TM42	32703	28678	12135	19979	10461	8984
TM5	36473	31832	15084	17661	9469	9469
TMR11	48741	40275	25437	17776	8531	6850

Taulukko L4. Sienten toiminnalliset ryhmät FUNGuild -työkalun (Nguyen ym. 2016) ekologisiin funktioihin (Guild) ja trofiatasoon (Trophic Mode) pohjautuen.

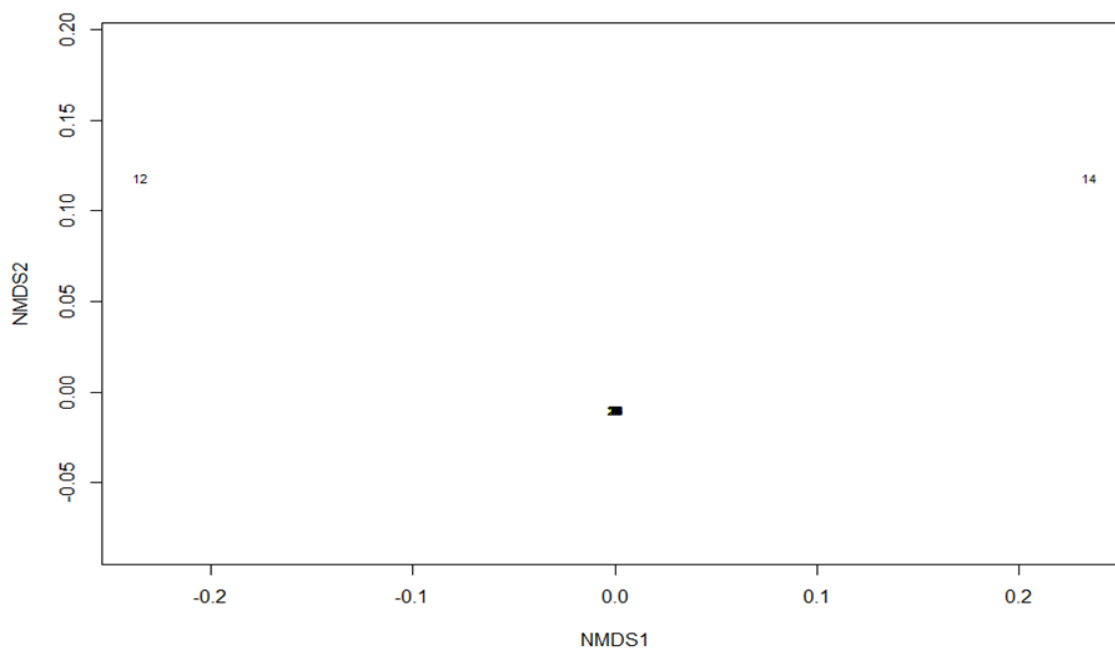
TOIMINNALLINEN RYHMÄ	GUILD ¹	TROPHIC MODE ¹
Ektomykorritsa (pintasienijuuri) **		
Ektomykorritsaa muodostavat kotelosienet	Dung Saprotroph-Ectomycorrhizal-Litter Saprotroph-Undefined Saprotroph	Saprotroph-Symbiotroph
	Ectomycorrhizal-Fungal Parasite-Plant Pathogen-Wood Saprotroph	Saprotroph-Symbiotroph
	Ectomycorrhizal	Symbiotroph
Ektomykorritsaa muodostavat kantasienet	Ectomycorrhizal	Symbiotroph
Erikoidimykorrhitsa (kanervasisienijuuri) kotelosienet *		
	Bryophyte Parasite-Ectomycorrhizal-Ericoid Mycorrhizal-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Bryophyte Parasite-Ectomycorrhizal-Ericoid Mycorrhizal-Undefined Saprotroph-Wood Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Ectomycorrhizal-Endophyte-Ericoid Mycorrhizal-Litter Saprotroph-Orchid Mycorrhizal	Saprotroph-Symbiotroph
Orkideamykorrhitsa (kämmeekkäsienijuuri) kantasienet *		
	Orchid Mycorrhizal	Symbiotroph
Muut symbiotrofit		
Muut symbionttiset kotelosienet	Endophyte-Plant Pathogen-Wood Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Endophyte-Plant Pathogen	Pathotroph-Symbiotroph
	Dung Saprotroph-Endophyte-Litter Saprotroph-Undefined Saprotroph	Saprotroph-Symbiotroph
	Endophyte-Undefined Saprotroph-Wood Saprotroph	Saprotroph-Symbiotroph
	Endophyte	Symbiotroph
Muut symbionttiset kantasienet	Endomycorrhizal-Plant Pathogen-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
Muut symbionttiset Glomeromycotat	Arbuscular Mycorrhizal	Symbiotroph
Muut symbionttiset Mortierellomycotat	Endophyte-Litter Saprotroph-Soil Saprotroph-Undefined Saprotroph	Saprotroph-Symbiotroph
Jäkälöityneet sienet		
Jäkälöityneet kotelosienet	Animal Pathogen-Endophyte-Fungal Parasite-Lichen Parasite-Plant Pathogen-Wood Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Animal Pathogen-Endophyte-Lichen Parasite-Plant Pathogen-Soil Saprotroph-Wood Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Animal Pathogen-Endophyte-Lichen Parasite-Plant Pathogen-Wood Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Endophyte-Lichen Parasite-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
Jäkälöityneet kantasienet	Epiphyte-Leaf Saprotroph-Lichen Parasite-Lichenized-Plant Pathogen-Wood Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
Saprotrofit (lahottaja)		
Saprotrofit kotelosienet	Animal Pathogen-Fungal Parasite-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph
	Animal Pathogen-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph

Saprofitit kantasienet	Dung Saprotroph	Saprotroph
	Dung Saprotroph-Undefined Saprotroph	Saprotroph
	Plant Saprotroph-Wood Saprotroph	Saprotroph
	Soil Saprotroph	Saprotroph
	Undefined Saprotroph	Saprotroph
	Undefined Saprotroph-Wood Saprotroph	Saprotroph
	Wood Saprotroph	Saprotroph
	Fungal Parasite-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph-Symbiotroph
	Dung Saprotroph-Plant Saprotroph-Wood Saprotroph	Saprotroph
	Soil Saprotroph	Saprotroph
	Undefined Saprotroph	Saprotroph
	Wood Saprotroph	Saprotroph
Patotrofit (taudinaiheuttaja)		
Patotrofit kotelosienet	Plant Pathogen	Pathotroph
	Animal Pathogen-Plant Pathogen-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph
	Fungal Parasite-Plant Pathogen-Plant Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph
	Plant Pathogen-Plant Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph
	Plant Pathogen-Undefined Saprotroph	Pathotroph-Saprotroph
Patotrofit kantasienet	Litter Saprotroph-Plant Pathogen	Pathotroph
	Plant Pathogen	Pathotroph
Määrittelemätön funktio		
Määrittelemättömät kotelosienet	-	-
Määrittelemättömät kantasienet	-	-
Määrittelemättömät tuntemattomat sienet	-	-

* sisäsienijuuri

** pintasienijuuri

¹ FUNGuild:sta saadut kategoriat



Kuva L1. NMDS-paikkaordinaatiokuva sienille, jossa näytteet 12 (Ka45=Koe-Karin) ja 14 (KaaRel=Ref-Karin) mukana. Näytteet 12 ja 14 sijaitsevat laidoilla, kaikki muut näytteet keskellä.

Taulukko L5. Bakteerien NMDS-yhteisöordinaatioihin sovitetut ympäristömuuttujat ja korrelaatiot eri akseleiden suhteen, sekä niiden r - ja p -arvot. NMDS1 = sijainti x-akselilla, NMDS2 = sijainti y- akselilla, r^2 = korrelaatiokerroin, p = merkitsevyysarvo. P-arvojen merkitsevyysvälit: (.) $p < 0,1$; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

MUUTTUJA	NMDS1	NMDS2	r^2	p	
Acidobacteriia (luokka)	0,212373	0,977189	0,170505	0,09	.
Solibacterales (lahko)	0,112981	0,993597	0,158255	0,094	.
Solibacteraceae (alaryhmä 3) (heimo)	0,112981	0,993597	0,158255	0,094	.
kandidaattiluokka 6 (luokka)	-0,61769	-0,78642	0,162968	0,08	.
aktinobakteerit (pääjakso)	-0,84251	-0,53868	0,186874	0,054	.
Micrococcales (lahko)	-0,24228	-0,97021	0,232811	0,032	*
Microbacteriaceae (heimo)	-0,25692	-0,96643	0,224822	0,042	*
Bacteroidetes (pääjakso)	-0,73749	-0,67536	0,35859	0,006	**
Bacteroidia (luokka)	-0,73758	-0,67525	0,360939	0,006	**
Cytophagales (lahko)	-0,6879	-0,7258	0,278413	0,018	*
Microscillaceae (heimo)	-0,72011	-0,69386	0,304822	0,014	*
Chloroflexi (pääjakso)	-0,9675	-0,25286	0,282076	0,016	*
Chloroflexia (luokka)	-0,97307	-0,23051	0,273542	0,038	*
Chloroflexales (lahko)	-0,98823	-0,15296	0,271912	0,041	*
Roseiflexaceae (heimo)	-0,99223	-0,12441	0,276859	0,043	*
KD4.96 (luokka)	-0,9457	-0,32505	0,162477	0,076	.
proteobakteerit (pääjakso)	0,910129	0,414325	0,277903	0,012	*
<i>Devosia</i> (suku)	-0,92333	-0,384	0,17753	0,08	.
Hyphomicrobiaceae (heimo)	0,081585	-0,99667	0,208038	0,046	*
Sphingomonadales (lahko)	-0,05131	-0,99868	0,321011	0,008	**
Sphingomonadaceae (heimo)	-0,05131	-0,99868	0,321011	0,008	**
<i>Novosphingobium</i> (suku)	-0,13805	-0,99042	0,276555	0,025	*

Myxococcales (lahko)	-0,95853	0,284991	0,191945	0,04	*
gammaproteobakteerit (luokka)	0,56931	0,822123	0,228842	0,059	.
Betaproteobacteriales (lahko)	0,718916	0,695097	0,200221	0,086	.
<i>Rhizobacter (suku)</i>	0,296005	0,955186	0,18729	0,061	.
<i>Rhodoferrax (suku)</i>	0,921615	-0,3881	0,168235	0,09	.
Gammaproteobacteria i.s. (lahko)	-0,60394	-0,79703	0,287566	0,016	*
<i>Acidibacter (suku)</i>	-0,60474	-0,79643	0,308313	0,012	*
Xanthomonadales (lahko)	0,245745	0,969334	0,290276	0,009	**
Rhodanobacteraceae (heimo)	0,187394	0,982285	0,506398	0,001	**
<i>Rhodanobacter (suku)</i>	0,18843	0,982087	0,621833	0,001	**
Xanthomonadaceae (heimo)	-0,06422	-0,99794	0,273093	0,02	*
ANAGLYCOLYSIS.PWY	-0,77827	-0,62793	0,184304	0,063	.
ARGSYNBSUB.PWY	0,583771	0,811918	0,248584	0,024	*
DAPLYSINESYN.PWY	0,824461	0,565918	0,172285	0,082	.
FAO.PWY	0,343438	0,939175	0,164316	0,097	.
GLUTORN.PWY	0,53703	0,843563	0,228919	0,027	*
GLYCOLYSIS	-0,99207	0,12567	0,193969	0,051	.
HSERMETANA.PWY	0,491014	0,871152	0,357642	0,002	**
NONOXIPENT.PWY	-0,68803	-0,72568	0,175573	0,089	.
PWY.2942	-0,75126	-0,66001	0,295057	0,011	*
PWY.5345	0,336249	0,941773	0,170634	0,065	.
PWY.5659	-0,62312	-0,78213	0,305782	0,005	**
PWY.7094	0,326199	0,945301	0,171135	0,091	.
SO4ASSIM.PWY	0,655279	0,755387	0,268948	0,013	*
SULFATE.CYS.PWY	0,707504	0,70671	0,281993	0,012	*
Pilou Evenness	-0,54807	-0,83643	0,225967	0,037	*

Taulukko L6. Sienien NMDS-yhteisöordinaatioihin sovitettujen ympäristömuuttujien ja korrelaatiot eri akselien suhteen, sekä niiden r- ja p-arvot. NMDS1 = sijainti x-akselilla, NMDS2 = sijainti y-akselilla, r^2 = korrelaatiokerroin, p = merkitsevyysarvo. P-arvojen merkitsevyysvälit: (.) $p < 0,1$; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

MUUTTUJA	NMDS1	NMDS2	r^2	p	
kotelosienet (pääjakso)	0,866306	-0,49951	0,336087	0,014	*
Leotiaceae (heimo)	0,554685	0,83206	0,264778	0,058	.
Pezizomycetes (luokka)	0,675558	-0,73731	0,249351	0,052	.
Pezizales (lahko)	0,675558	-0,73731	0,249351	0,052	.
Pyronemataceae (heimo)	0,258138	-0,96611	0,328965	0,014	*
<i>Geopora (suku)</i>	0,258062	-0,96613	0,328705	0,014	*
Sebacinales (lahko)	0,346538	0,938036	0,304744	0,016	*
Serendipitaceae (heimo)	0,319257	0,947668	0,294738	0,017	*
<i>Serendipita (suku)</i>	0,302874	0,953031	0,289991	0,02	*
Ektomykorritsa kotelosienet	0,675209	-0,73763	0,249951	0,052	.
Ektomykorritsa kantasienet	-0,98838	-0,15203	0,217865	0,064	.
Orkideamykorritsa kantasienet	0,302874	0,953031	0,289991	0,02	*
Pilou Evenness	0,544411	0,838818	0,355748	0,011	*
kuivabiomassa	-0,57435	0,818608	0,279724	0,05	.

Taulukko L7. Pajunäytteiden biomassat kasvupaikan (koe/kontrolli) ja lajikkeen (Gudrun/Karin/Klara/Torangi) mukaan esitettyinä. Torangi = Torangin maatiainen.

KOE			KONTROLLI (REF)		
näyte	lajike	kuivabiomassa (g)	näyte	lajike	kuivabiomassa (g)
G44	Gudrun	825,02	GR9	Gudrun	56,00
G12	Gudrun	482,39	GR10	Gudrun	27,94
G3	Gudrun	55,62	GR12	Gudrun	11,74
G36	Gudrun	10,69	GR15	Gudrun	9,30
G28	Gudrun	1,78	GR17*	Gudrun	3,51
Ka8	Karin	286,51	KaaRe1**	Karin	0,72
Ka45**	Karin	260,12			
Ka29	Karin	116,70			
Ka21	Karin	16,39			
Ka4*	Karin	11,64			
KL39	Klara	406,28	KIR5*	Klara	5,27
KL19	Klara	236,04	KIR2	Klara	5,08
KL31	Klara	29,79	KIR7	Klara	1,42
KL6*	Klara	26,62			
KL11	Klara	0,53			
TM42	Torangi	36,04	TMR11	Torangi	3,47
TM30	Torangi	8,50			
TM38	Torangi	4,57			
TM3,18	Torangi	0,87			
TM5	Torangi	0,33			

*näytteestä ei saatu eristettyä riittävästi sienisekvenssejä sienianalyysistä varten.

**sienien tilastollisista testeistä (poikkeus sieniyhteisöjen pylväskaavio-kuvat 12 ja 13) pois jätetyt näytteet

Taulukko L8. Bakteerien diversiteetti-indeksien lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit. Lyhenteet: L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

DIVERSITEETTI INDEKSIT	L	K	B	L x K	L x B	K x B	L x K x B
Species Richness	8,0183**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pilou Evenness	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Simpson	3,9602*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Inverted Simpson	4,6900*	NS	5,0783*	NS	NS	NS	NS
Shannon-Weaver	9,2278***	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Taulukko L9. Bakteeritaksonien lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit. Lyhenteet: % = taksonin prosentuaalinen osuus koko datasta, L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

BAKTEERI TAKSONI	%	L	K	B	L x K	L x B	K x B	L x K x B
acidobakteerit (pääjakso)	9,8	3,529*	NS	NS	2,523	NS	5,359*	NS
Acidobacteriia (luokka)	2,1	NS	21,192***	NS	5,541**	NS	NS	NS
Solibacterales (lahko)	1,1	6,712*	7,994*	NS	3,172	NS	NS	NS
Solibacteraceae (alaryhmä 3) (heimo)	1,1	2,820	7,994*	NS	3,172	NS	NS	NS
Thermoanaerobaculia (luokka)	2,1	NS	3,233	NS	NS	NS	NS	NS
Thermoanaerobaculales (lahko)	2,1	NS	3,233	NS	NS	NS	NS	NS
Thermoanaerobaculaceae (heimo)	2,1	NS	3,233	NS	NS	NS	NS	NS
<i>kandidaattisuku 10 (suku)</i>	2,1	NS	3,243	NS	NS	NS	NS	NS
kandidaattiluokka 6 (luokka)	2,7	NS	8,985**	NS	NS	NS	5,372*	NS
kandidaattiluokka 17 (luokka)	1,3	3,074	NS	NS	NS	NS	4,184	NS
aktinobakteerit (pääjakso)	9,3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Thermoleophilia (luokka)	1,4	NS	NS	3,134	NS	NS	NS	NS
Armatimonadetes (pääjakso)	0,7	NS	18,148***	NS	2,792	2,970	NS	NS
Bacteroidetes (pääjakso)	6,3	NS	4,922*	NS	NS	NS	NS	NS
Bacteroidia (luokka)	6,2	NS	4,690*	NS	NS	NS	NS	NS
Chitinophagales (lahko)	2,2	4,120*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Chitinophagaceae (heimo)	1,9	3,058	NS	NS	NS	2,589	NS	NS
Chloroflexi (pääjakso)	4,1	3,405*	10,158**	NS	NS	NS	NS	NS
Chloroflexia (luokka)	1,3	3,225	11,622**	NS	NS	6,633**	NS	NS
Chloroflexales (lahko)	1,3	3,490*	10,679**	NS	NS	6,981**	NS	NS
Roseiflexaceae (heimo)	1,2	3,430*	8,760**	NS	NS	5,958**	NS	NS
Dependentiae(pääjakso)	0,0	NS	NS	NS	3,251*	NS	NS	NS
Elusimicrobia (pääjakso)	0,0	NS	NS	NS	2,598	NS	NS	NS
FCPU426 (kandidaattipääjakso)	0,0	3,735*	NS	5,815*	NS	NS	NS	3,231
Firmicutes (pääjakso)	0,6	NS	NS	5,000*	NS	NS	NS	NS
Gemmatimonadetes (pääjakso)	1,0	5,184*	6,476*	4,400	NS	NS	13,187**	NS
Gemmatimonadetes (luokka)	1,0	5,112*	6,456*	4,381	NS	NS	13,083**	NS
Gemmatimonadales (lahko)	1,0	5,112*	6,456*	4,381	NS	NS	13,083**	NS
Gemmatimonadaceae (heimo)	1,0	5,112*	6,456*	4,381	NS	NS	13,083**	NS
latescibakteerit (pääjakso)	0,0	2,877	NS	5,411*	NS	NS	NS	NS
Nitrospirae (pääjakso)	0,2	NS	8,107*	6,641*	NS	2,937	NS	NS
patescibakteerit (pääjakso)	0,1	7,182**	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Planctomycetes (pääjakso)	1,4	4,497*	4,637*	NS	NS	NS	NS	NS
Planctomycetacia (luokka)	1,3	4,279*	4,694*	NS	NS	NS	NS	NS

Taulukko L9 jatkuu Bakteeritaksonien lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit. Lyhenteet: % = taksonin prosentuaalinen osuus koko datasta, L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

BAKTEERI TAKSONI	%	L	K	B	L x K	L x B	K x B	L x K x B
proteobakteerit (pääjakso)	65,2	2,967	NS	NS	NS	NS	NS	NS
alfa-proteobakteerit (luokka)	25,9	3,869*	3,176	NS	NS	NS	NS	NS
Rhizobiales (lahko)	18,0	4,08*	25,344***	NS	NS	NS	4,731*	3,654
Beijerinckiaceae (heimo)	2,7	NS	10,768**	NS	NS	NS	NS	NS
Devosiaceae (heimo)	1,6	NS	12,776**	NS	NS	4,894*	NS	NS
<i>Devosia</i> (suku)	1,3	NS	10,612**	NS	NS	3,576*	NS	NS
Hyphomicrobiaceae (heimo)	1,5	NS	4,820*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Hyphomicrobium</i> (suku)	1,2	NS	9,365**	NS	NS	NS	NS	NS
Rhizobiaceae (heimo)	2,6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	3,590
<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i> (suku)	1,8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	3,516
Rhizobiales i.s. (heimo)	1,5	NS	6,075*	NS	NS	NS	NS	NS
Xanthobacteraceae (heimo)	6,8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Bradyrhizobium</i> (suku)	1,6	NS	7,174*	NS	NS	NS	NS	NS
Sphingomonadales (lahko)	2,1	NS	6,712*	NS	NS	NS	NS	NS
Sphingomonadaceae (heimo)	2,1	NS	6,712*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Novosphingobium</i> (suku)	1,2	NS	11,221**	NS	NS	NS	NS	NS
gammaproteobakteerit (luokka)	36,2	2,660	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Betaproteobacteriales (lahko)	25,0	3,883*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Burkholderiaceae (heimo)	19,4	2,818	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Rhodoferrax</i> (suku)	2,8	5,913**	NS	NS	3,715*	NS	NS	NS
Nitrosomonadaceae (heimo)	1,7	4,107*	NS	5,410*	3,216	2,856	3,565	NS
Gammaproteobacteria i.s. (lahko)	1,7	NS	3,916	NS	NS	NS	NS	NS
tuntematon heimo (heimo)								
<i>Acidibacter</i> (suku)	1,6	NS	3,777	NS	NS	NS	NS	NS
Xanthomonadales (lahko)	6,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rhodanobacteraceae (heimo)	5,1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Dokdonella</i> (suku)	1,2	NS	8,039*	NS	NS	NS	NS	NS
Xanthomonadaceae (heimo)	1,6	NS	5,019*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Arenimonas</i> (suku)	1,0	NS	24,507***	NS	NS	NS	NS	NS
WPS.2 (kandidaattipääjakso)	0,0	NS	NS	3,719	8,313**	NS	NS	43,008***
tunnistamattomat bakteerit	0,1	3,749*	34,818***	7,823*	16,291***	NS	7,075*	NS

Taulukko L10. Käsittely- ja pajulajikekohtaiset lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit niille bakteeritaksoneille, joilla havaittiin yhdysvaikutuksia taulukoissa L9 esitetyissä merkitsevyystestauksissa. Karin ja Torangin maatiainen -lajikkeille ei saatu KxB yhdysvaikutusta, koska kontrollialueelta lajikkeita oli vain yksi näyte. Tyhjät rivit/lisänimet ovat taksonomisen selkeyden vuoksi lisättyjä ylärhymiä. Lyhenteet: L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () $p < 0,1$; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (NS) – ei merkitsevää; (-) – ei havaittu bakteeriryhmän lajeja.

	Koe			Kontrolli			Gudrun			Karin		Klara			Torangi	
BAKTEERI TAKSONI	L	B	L x B	L	B	L x B	K	B	K x B	K	B	K	B	K x B	K	B
acidobakteerit	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	5,289	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Acidobacteriia	NS	NS	NS	12,769*	NS	NS	NS	NS	NS	22,145*	NS	NS	NS	NS	15,313*	NS
Solibacterales	NS	NS	NS	6,537	NS	NS	NS	NS	NS	6,360	NS	NS	NS	NS	17,013*	NS
Solibacteraceae (alaryhmä 3)	NS	NS	NS	6,537	NS	NS	NS	NS	NS	6,360	NS	NS	NS	NS	17,013*	NS
kandidaattiluokka 6	NS	NS	NS	25,385**	103,155** *	8,717*	19,480**	6,705*	21,031* *	NS	NS	42,982**	NS	7,318	NS	NS
kandidaattiluokka 17	NS	NS	NS	7,697*	13,385*	NS	NS	NS	12,259*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Armatimonadetes	NS	NS	NS	7,054*	NS	NS	23,208**	NS	NS	48,142**	24,723 *	NS	5,363 3	NS	NS	NS
Bacteroidetes:											10,856 *					
Chitinophagaceae	NS	NS	2,650	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
Chloroflexi:			6,129*													
Chloroflexia	NS	NS	*	NS	NS	NS	4,236	NS	NS	NS	5,643	6,276	NS	NS	52,299**	77,080* *
Chloroflexales	2,614	NS	6,319* *	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	6,116	6,564	NS	NS	27,069*	30,577*
Roseiflexaceae	2,672	NS	5,426*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	5,849	6,704	NS	NS	13,152*	8,699
Dependentiae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	1,0e ⁺³² ** *	NS	NS	NS	NS	NS	58,727* *
Elusimicrobia	NS	NS	NS	4,339	NS	NS	NS	NS	NS	4,4e ⁺³³ ** *	NS	NS	NS	NS	NS	NS
FCPU426	3,273	4,056	NS	400,726** *	10,847*	2072,260** *	NS	14,115**	NS	-	-	NS	NS	NS	NS	NS
Gemmatimonadetes	2,974	4,057	NS	NS	8,285*	NS	NS	NS	7,588*	14,445*	NS	NS	NS	NS	14,571*	NS
Gemmatimonadetes	2,900	4,006	NS	NS	8,285*	NS	NS	NS	7,588*	14,445*	NS	NS	NS	NS	13,483*	NS
Gemmatimonadales	2,900	4,006	NS	NS	8,285*	NS	NS	NS	7,588*	14,445*	NS	NS	NS	NS	13,483*	NS
Gemmatimonadaceae	2,900	4,006	NS	NS	8,285*	NS	NS	NS	7,588*	14,445*	NS	NS	NS	NS	13,483*	NS
Nitrospirae	NS	5,071 *	NS	NS	25,569**	38,180**	64,138** *	75,382** *	NS	NS	11,296 *	NS	NS	NS	NS	39,456* *
proteobakteerit																
Rhizobiales	NS	NS	NS	NS	NS	NS	10,540*	NS	NS	NS	NS	58,707**	NS	14,386*	NS	NS
Devosiaceae	NS	NS	3,860*	NS	NS	NS	11,605*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	5,760	11,160*
Devosia	NS	NS	2,803	NS	NS	17,492*	12,108*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rhizobiaceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gammaproteobakteerit:	4,183 *	NS	NS	5,683	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rhodospirillum rubrum	3,875 *	4,208	3,234	NS	NS	NS	6,981*	14,448**	7,120*	30,711*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nitrosomonadaceae		5,118 *		243,496** *	10,85* *		NS	NS	NS	-	-	652,221** *	NS	2082,949** *	-	-
WPS.2	3,133		NS													
tunnistamattomat bakteerit	NS	NS	NS	13,705*	4,980	NS	NS	NS	NS	42,959**	NS	19,929*	NS	NS	464,917** *	NS

Taulukko L11. Bakteerien Beijerinckiaceae-heimon sekvenssien prosenttipisterunsaudet (percentile abundances) näytteryhmittäin. Koe = koealue eli pajukosteikko, Ref = kontrollialue ja Torangi = Torangin maatiainen. Kontrollialueella Karin ja Torangin maatiainen -näytteitä oli vain yksi molempia ja Klara -näytteitä kolme kappaletta.

Ryhmä/prosenttipiste	0	25	50	75	100	Ryhmä/prosenttipiste	0	25	50	75	100
Koe-Gudrun	1	1	1	1	40	Ref-Gudrun	67	89	494	1850	2664
Koe-Karin	1	1	1	1	50	Ref-Karin	252	252	252	252	252
Koe-Klara	1	1	1	1	12	Ref-Klara	160	280,5	401	983	1565
Koe-Torangi	1	1	1	1	7	Ref-Torangi	637	637	637	637	637

Taulukko L12. Bakteeriyhteisöjen biosynteesireitit SSGCID (Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease) mukaan (Children's Research Institute 2019) ja biosynteesireittien lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit. Lyhenteet: % = taksonin prosentuaalinen osuus koko datasta, L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

PICRUSt2-lyhenne	%	L	K	B	BIOSYNTEESIREITTI
ANAGLYCOLYSIS.PWY	0,5	NS	NS	NS	glycolysis III (from glucose)
ARGSYNBSUB.PWY	0,6	NS	NS	NS	L-arginine biosynthesis II (acetyl cycle)
CALVIN.PWY	0,6	NS	NS	NS	Calvin-Benson-Bassham cycle
FAO.PWY	0,8	NS	NS	NS	fatty acid beta-oxidation I
GLUTORN.PWY	0,5	NS	NS	NS	L-ornithine biosynthesis I
GLYCOLYSIS	0,5	3,087	NS	NS	glycolysis I (from glucose 6-phosphate)
HSERMETANA.PWY	0,6	NS	NS	NS	L-methionine biosynthesis III
NONOXIPENT.PWY	0,7	NS	NS	NS	pentose phosphate pathway (non-oxidative branch)
PEPTIDOGLYCANSYN.PWY	0,5	2,486	NS	NS	peptidoglycan biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)
POLYISOPRENSYN.PWY	0,5	NS	NS	NS	polyisoprenoid biosynthesis (E. coli)
PWY.2942	0,6	NS	NS	NS	L-lysine biosynthesis III
PWY.3781	1,6	3,065	NS	NS	aerobic respiration I (cytochrome c) [Suom. aerobinen hengitys I (sytokromi c)]
PWY.5097	0,6	NS	NS	NS	L-lysine biosynthesis VI
PWY.5345	0,5	NS	4,412	NS	superpathway of L-methionine biosynthesis (by sulfhydrylation)
PWY.5659	0,6	NS	NS	NS	GDP-mannose biosynthesis
PWY.6385	0,5	NS	NS	NS	peptidoglycan biosynthesis III (mycobacteria)
PWY.6386	0,5	NS	NS	NS	UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis II (lysine-containing)
PWY.6387	0,5	NS	NS	NS	UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide biosynthesis I (meso-diaminopimelate containing)
PWY.7094	0,8	NS	NS	NS	fatty acid salvage
PWY.7208	0,6	3,943*	NS	NS	superpathway of pyrimidine nucleobases salvage [Suom. pyrimidiini-nukleobaasien talteenoton superpathway]
PWY.7221	0,6	3,913*	NS	NS	guanosine ribonucleotides de novo biosynthesis [Suom. guansiini-ribonukleotidien de novo biosynteesi]
PWY.7228	0,6	3,082	NS	NS	superpathway of guanosine nucleotides de novo biosynthesis I
SO4ASSIM.PWY	0,5	NS	3,863	NS	assimilatory sulfate reduction I
SULFATE.CYS.PWY	0,6	NS	NS	NS	superpathway of sulfate assimilation and cysteine biosynthesis
THRESYN.PWY	0,6	NS	NS	NS	L-threonine biosynthesis

Taulukko L13. Sienitaksonien lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyydestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit. Lyhenteet: % = taksonin prosentuaalinen osuus koko datasta, L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

SIENI TAKSONI	%	L	K	B	L x K	L x B	K x B	L x K x B
kotelosienet (pääjakso)	43,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dothideomycetes (luokka)	2,2	3,766*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pleosporales (lahko)	2,1	4,010*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lindgomycetaceae (heimo)	1,1	3,990*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Clohesyomyces</i> (suku)	1,1	3,990*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Leotiomycetes (luokka)	15,2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Helotiales (lahko)	14,9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Leotiaceae (heimo)	2,0	23,655***	23,211***	6,991*	3,392	22,631***	4,118	3,463
<i>Neobulgaria</i> (suku)	1,0	5,911*	4,827	NS	NS	2,784	NS	NS
Vibrissaceae (heimo)	3,1	NS	6,794*	NS	NS	NS	6,247*	NS
<i>Phialocephala</i> (suku)	2,9	NS	7,421*	NS	NS	NS	6,910*	NS
Pezizomycetes (luokka)	23,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pezizales (lahko)	23,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pezizaceae (heimo)	16,4	NS	NS	3,755	NS	NS	3,953	NS
<i>Peziza</i> (suku)	16,4	NS	NS	3,755	NS	NS	3,953	NS
Sordariomycetes (luokka)	2,3	16,290***	5,067*	NS	22,721***	4,049*	NS	106,044***
kantasienet (pääjakso)	45,0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glomeromycota (pääjakso)	0,0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mortierellomycota (pääjakso)	0,2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	4,150
tunnistamattomat sienet	11,1	NS	3,654	NS	NS	NS	NS	NS

Taulukko L14. Käsittely- ja pajulajikekohtaiset lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit niille sienitaksoneille, joilla havaittiin yhdysvaikutuksia taulukossa L13 esitetyissä merkitsevyystestauksissa. Karin-lajikkeelle ei saatu tuloksia vähäisen näytemäärän vuoksi (ei kontrollinäytteitä) ja Torangin maataislajikkeelle ei voitu laskea KxB yhdysvaikutusta, koska kontrollialueelta oli vain yksi näyte. Taksonomisen selkeyden vuoksi lisätty ylärühmät (""). Lyhenteet: L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

	Koe			Kontrolli			Gudrun			Klara			Torangi	
SIENI TAKSONI	L	B	L x B	L	B	L x B	K	B	K x B	K	B	K x B	K	B
kotelosienet/Leotiomycetes: Leotiaceae	39,557***	12,359**	31,082***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	126,216**	NS	35,945*	553,292***	NS
<i>Neobulgaria</i>	12,490**	NS	5,057*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	145,088**	NS	NS	500,717***	NS
Vibrisseaceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	17,061	NS	9,935	NS	NS
<i>Phialocephala</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	10,109	NS	NS	11,419*	NS
Pezizomycetes: Pezizaceae	NS	4,358	NS	NS	NS	NS	NS	6,857*	8,953*	NS	8,994	NS	NS	NS
<i>Peziza</i>	NS	4,358	NS	NS	NS	NS	NS	6,857*	8,953*	NS	8,994	NS	NS	NS
Sordariomycetes	NS	NS	3,796	81,646*	NS	189,856**	NS	NS	NS	90,788*	15,564	205,995**	NS	NS
Mortierellomycota	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	71,326*	NS	121,210**	NS	NS

Taulukko L5. Sienien toiminnallisille ryhmille rakennettujen lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit. Lyhenteet: % = taksonin prosentuaalinen osuus koko datasta, L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä.

TOIMINNALLISET RYHMÄT	%	L	K	B	L x K	L x B	K x B	L x K x B
Pintasienijuuri (Ektomykorritsa)	48,3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pintasienijuuri kotelosienet	23,8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Pintasienijuuri kantasienet	24,5	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Kanervasierijuuri (Erikoidimykorrhitsa) kotelosienet	1,8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Kämmekkäsienijuuri (Orkideamykorritsa) kantasienet	17,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
muut symbiotrofit	7,0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
muut symbiotrofit kotelosienet	6,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
muut symbiotrofit kantasienet	0,1	NS	NS	NS	3,490	NS	NS	8,086*
muut symbiotrofit Glomeromycota	0,0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
muut symbiotrofit Mortierellomycota	0,2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	4,150

Jäkälöityneet sienet	0,8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Jäkälöityneet kotelosienet	0,2	NS	NS	NS	5,225*	5,225*	NS	9,627*
Jäkälöityneet kantasienet	0,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lahottaja (Saprotrofi)	5,1	6,718**	20,521***	NS	8,033**	NS	NS	13,040**
Lahottaja kotelosienet	4,7	6,013*	18,950**	NS	8,636**	NS	NS	15,614**
Lahottaja kantasienet	0,4	NS	NS	NS	NS	4,966*	NS	NS
Taudinaiheuttaja (Patotrofi)	0,9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Taudinaiheuttaja kotelosienet	0,9	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Taudinaiheuttaja kantasienet	0,0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Määrittelemätön funktio	18,4	NS	3,721	NS	NS	NS	NS	NS
määrittelemättömät kotelosienet	5,7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
määrittelemättömät kantasienet	1,6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
määrittelemättömät tuntemattomat sienet	11,1	NS	3,654	NS	NS	NS	NS	NS

Taulukko L16. Käsittely- ja pajulajikekohtaiset lineaaristen mallien (lm) ANOVA-merkitsevyystestien F-arvot ja p-arvojen merkitsevyysvälit niille sienien toiminnallisille ryhmille, joilla havaittiin yhdysvaikutuksia taulukossa L15 esitetyissä merkitsevyystestauksissa. Karin-lajikkeelle ei saatu tuloksia vähäisen näytemäärän vuoksi (ei kontrollinäytteitä) ja Torangin maataislajikkeelle ei voitu laskea KxB yhdysvaikutusta, koska kontrollialueelta oli vain yksi näyte. Lyhenteet: L = lajike, K = käsittely, B = biomassa, x = muuttujien yhdysvaikutus lm-mallissa. p-arvojen merkitsevyysvälit: () p < 0,1; (*) p < 0,05; (**) p < 0,01; (***) p < 0,001; (NS) – ei merkitsevä; (-) – lajikkeella ei havaittu toiminnallisen ryhmän sienilajeja ollenkaan. Punaisella maalattujen arvojen toiminnallista sieniryhmää havaittiin Klara-lajikkeella vain kontrollialueella.

	Koe			Kontrolli			Gudrun			Klara			Torangi	
TOIMINNALLISET RYHMÄT	L	B	L x B	L	B	L x B	K	B	K x B	K	B	K x B	K	B
muut symbiotrofit		N		2,3e ^{+30**}	3,1e ^{+28**}	6,3e ^{+30**}	N	N						
muut symbiotrofit kantasienet	NS	S	NS	*	*	*	S	S	NS	8,8e ^{+30***}	8,1e ^{+26**} *	1,3e ^{+31**} *	-	-
muut symbiotrofit Mortierellomycota	NS	S	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	71,326*	NS	121,210*	NS	NS
Jäkälöityneet sienet		N	11,865*				N	N						
Jäkälöityneet kotelosienet	NS	S	*	16,976	NS	59,585*	S	S	NS	1,4e ^{+31***}	1,3e ^{+27**} *	2,2e ^{+31**} *	NS	18,447*
Lahottaja (Saprotrofi)	11,019*	N					N	N						
Lahottaja kotelosienet	*	S	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	933,805**	11,924	375,633*	NS	NS
Lahottaja kantasienet	7,409**	S	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	1129,60**	15,24	556,08**	NS	NS
Lahottaja kantasienet	NS	S	4,180*	16,914	NS	NS	S	S	NS	NS	NS	14,1625	765,17**	NS

Taulukko L17. Sienien Melanommataceae-heimon sekvenssien prosenttipisterunsaudet ryhmittäin. Koe = koealue, Ref = kontrollialue ja Torangi = Torangin maatiainen.

Ryhmä/prosenttipiste	0	25	50	75	100	Ryhmä/prosenttipiste	0	25	50	75	100
Koe-Gudrun	1	1	1	1	1	Ref-Gudrun	1	1	1	1	1
Koe-Karin	1	1	1	1	1	Ref-Karin	158	158	158	158	158
Koe-Klara	1	1	1	1	1	Ref-Klara	1	1	1	1	1
Koe-Torangi	1	1	1	1	1	Ref-Torangi	1	1	1	1	1

QIIME2-scriptit

Käytetyt QIIME2-versiot: 2019.1 ja 2019.4

Datan siistiminen (alle 100 bp pituisten sekvenssien poisto) ja importtaaminen

```
cutadapt -m 100 -o /over100bp_HUJAreads.fastq /R_2018_07_03_05_10_14_user_SN1-56-yht2018_318.2018-07-03T02:10:14Z.318C/R_2018_07_03_05_10_14_user_SN1-56-yht2018_318.2018-07-03T02:10:14Z.318C.fastq.gz
/over100bp_HUJAreads.fastq
qiime tools import --type MultiplexedSingleEndBarcodeInSequence --input-path /over100bp_HUJAreads.fastq.gz --output-path /over100bp_HUJAreads.qza
```

1. Bakteerit

Demultipleksaus ja primereiden poisto

```
qiime cutadapt demux-single --i-seqs /over100bp_HUJAreads.qza --m-barcode-file /Huja_metadata.txt --m-barcode-column 16SBarcodeSequence --output-dir /demuxed --verbose
qiime cutadapt trim-single --i-demultiplexed-sequences /16S-demuxed/per_sample_sequences.qza --p-cores 2 --p-adapter CCGTCAATTCTTTRAGTTT$ --p-front ^ACAGCMGCCGCGTAATWC --p-times 1 --p-overlap 12 --o-trimmed-sequences /16S-demuxed/trimmed_sequences_per_sample.qza
```

Laatukontrolli (quality control) DADA2:lla

```
qiime dada2 denoise-single --p-trunc-len 220 --p-n-threads 0 --output-dir /16S-denoised --i-demultiplexed-seqs /16S-demuxed/trimmed_sequences_per_sample.qza
```

Training SILVA based classifier

```
qiime tools import --type 'FeatureData[Sequence]' --input-path /SILVA_132_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/99/silva_132_99_16S.fna --output-path /SILVA_132_QIIME_release/silva_132_99_16S.qza
--type 'FeatureData[Taxonomy]' --input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat --input-path /SILVA_132_QIIME_release/taxonomy/16S_only/99/taxonomy_7_levels.txt --output-path /SILVA_132_QIIME_release/taxonomy_7_levels.txt.qza
qiime feature-classifier extract-reads --i-sequences /SILVA_132_QIIME_release/silva_132_99_16S.qza --p-f-primer ACAGCMGCCGCGTAATWC --p-r-primer CCGTCAATTCTTTRAGTTT --o-reads /SILVA_132_QIIME_release/silva_132_99_16S_extracted_ref-seqs.qza
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes --i-reference-reads /SILVA_132_QIIME_release/silva_132_99_16S_extracted_ref-seqs.qza --i-reference-taxonomy /SILVA_132_QIIME_release/taxonomy_7_levels.txt.qza --o-classifier /SILVA_132_QIIME_release/519F-926R_classifier.qza
```

Taksonomian määrittäminen

```
qiime feature-classifier classify-sklearn --i-classifier /SILVA_132_QIIME_release/Silva_519F-926R_classifier.qza --i-reads /16S-denoised/representative_sequences.qza --o-classification /16S-denoised/16S-taxonomy.qza
```

Datan filterointi (mitokondrioiden ja kloroplastien poisto table- ja rep-set-tiedostoista)

```
qiime taxa filter-table --i-table /16S-denoised/table.qza --i-taxonomy /16S-denoised/16S-taxonomy.qza --p-exclude mitochondria,chloroplast --o-filtered-table /16S-denoised/table-no-mitochondria-chloroplast.qza
qiime taxa filter-seqs --i-sequences /16S-denoised/representative_sequences.qza --i-taxonomy /16S-denoised/16S-taxonomy.qza --p-exclude mitochondria,chloroplast --o-filtered-sequences /16S-denoised/representative_sequences-no-mitochondria-chloroplast.qza
```

ANCOM-analyysi

```
qiime taxa collapse --i-table /16S-denoised/table-no-mitochondria-chloroplast.qza --i-taxonomy /16S-denoised/16S-taxonomy.qza --p-level 6 --o-collapsed-table /16S-denoised/table-no-mitochondria-chloroplast-l6.qza
qiime composition add-pseudocount --i-table /16S-denoised/table-no-mitochondria-chloroplast-l6.qza --o-composition-table /16S-denoised/comp-table-no-mitochondria-chloroplast-l6.qza
qiime composition ancom --i-table /16S-denoised/comp-table-no-mitochondria-chloroplast-l6.qza --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --m-metadata-column Kasittely-Lajike --o-visualization /16S-denoised/l6-ancom-Kasittely-Lajike.qzv
```

GNEISS-analyysi

```
qiime feature-table filter-features --i-table /16S-denoised/table-no-mitochondria-chloroplast.qza --p-min-samples 2 --o-filtered-table /16S-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza
```

qiime gneiss correlation-clustering --i-table /16S-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --o-clustering /16S-denoised/hierarchy.qza

qiime gneiss ilr-hierarchical --i-table /16S-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --i-tree /16S-denoised/hierarchy.qza --o-balances /16S-denoised/balances.qza

qiime gneiss ols-regression --p-formula "Lajike+Kasittely" --i-table /16S-denoised/balances.qza --i-tree /16S-denoised/hierarchy.qza --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --o-visualization /16S-denoised/regression_summary.qzv

qiime gneiss dendrogram-heatmap --i-table /16S-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --i-tree /16S-denoised/hierarchy.qza --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --m-metadata-column Kasittely-Lajike --p-color-map seismic --o-visualization /16S-denoised/heatmap.qzv

qiime gneiss balance-taxonomy --i-table /16S-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --i-tree /16S-denoised/hierarchy.qza --i-taxonomy /16S-denoised/16S-taxonomy.qza --p-taxa-level 2 --p-balance-name 'y0' --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --m-metadata-column Kasittely-Lajike --o-visualization /16S-denoised/y0_taxa_summary.qzv

PiCRUST2-analyysi

qiime picrust2 full-pipeline --i-table /16S-denoised/table-no-mitochondria-chloroplast.qza --i-seq /16S-denoised/representative_sequences-no-mitochondria-chloroplast.qza --output-dir /16S-denoised/q2-picrust2_output --p-threads 4 --verbose

2. Sienet

Demultipleksaus ja primereiden poisto

qiime cutadapt demux-single --i-seqs /over100bp_HUJAreads.qza --m-barcodes-file /Huja_metadata.txt --m-barcodes-column ITS2BarcodeSequence --output-dir /ITS2-demuxed --verbose

qiime cutadapt trim-single --i-demultiplexed-sequences /ITS2-demuxed/per_sample_sequences.qza --p-cores 2 --p-adapter GTGARTCATCGAATCTTTG\$ --p-front ^TCCTCCGCTTATTGATATGC --p-times 1 --p-overlap 12 --o-trimmed-sequences /ITS2-demuxed/trimmed_sequences_per_sample.qza

Laatukontrolli (quality filtering) DADA2:lla

qiime dada2 denoise-single --p-trunc-len 0 --p-n-threads 0 --output-dir /ITS2-denoised --i-demultiplexed-seqs /ITS2-demuxed/trimmed_sequences_per_sample.qza

Datan filteröinti (alle 100 bp pituiset sekvenssit table- ja rep-set-tiedostosta FeatureID:n perusteella, sekä näytteet, joissa alle 1000 sekvenssiä table-tiedostosta SampleID:n perusteella)

qiime feature-table filter-features --i-table /ITS2-denoised/table.qza --m-metadata-file /FeatureID-exclude.txt --p-exclude-ids --o-filtered-table /ITS2-denoised/features-filtered-table.qza

qiime feature-table filter-seqs --i-data /ITS2-denoised/representative_sequences.qza --m-metadata-file /FeatureID-exclude.txt --p-exclude-ids --o-filtered-data /ITS2-denoised/filtered_representative_sequences.qza

qiime feature-table filter-samples --i-table /ITS2-denoised/features-filtered-table.qza --m-metadata-file /SampleID-excluded.txt --p-exclude-ids --o-filtered-table /ITS2-denoised/features-samples-filtered-table.qza

Training UNITE based classifier

qiime tools import --type 'FeatureData[Sequence]' --input-path /sh_refs_qiime_ver8_dynamic_s_02.02.2019.fasta --output-path /UNITE_ver8_dynamic_02022019/sh_refs_qiime_ver8_dynamic_s_02022019.qza

--type 'FeatureData[Taxonomy]' --input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat --input-path /sh_taxonomy_qiime_ver8_dynamic_s_02.02.2019.txt --output-path /UNITE_ver8_dynamic_02022019/sh_taxonomy_qiime_ver8_dynamic_s_02022019.qza

qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes --i-reference-reads /UNITE_ver8_dynamic_02022019/sh_refs_qiime_ver8_dynamic_s_02022019.qza --i-reference-taxonomy /UNITE_ver8_dynamic_02022019/sh_taxonomy_qiime_ver8_dynamic_s_02022019.qza --o-classifier /UNITE_ver8_dynamic_02022019/UNITE-classifier.qza

Taksonomian määrittäminen

qiime feature-classifier classify-sklearn --i-classifier /UNITE_ver8_dynamic_02022019/UNITE-classifier.qza --i-reads /ITS2-denoised/filtered_representative_sequences.qza --o-classification /ITS2-denoised/ITS2-taxonomy.qza

GNEISS-analyysi

qiime feature-table filter-features --i-table /ITS2-denoised/features-samples-filtered-table.qza --p-min-samples 2 --o-filtered-table /ITS2-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza

qiime gneiss correlation-clustering --i-table /ITS2-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --o-clustering /ITS2-denoised/hierarchy.qza

qiime gneiss ilr-hierarchical --i-table /ITS2-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --i-tree /ITS2-denoised/hierarchy.qza --o-balances /ITS2-denoised/balances.qza

qiime gneiss ols-regression --p-formula "Lajike+Kasittely" --i-table /ITS2-denoised/balances.qza --i-tree /ITS2-denoised/hierarchy.qza --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --o-visualization /ITS2-denoised/regression_summary.qzv

qiime gneiss dendrogram-heatmap --i-table /ITS2-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --i-tree /ITS2-denoised/hierarchy.qza --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --m-metadata-column Kasittely-Lajike --p-color-map seismic --o-visualization /ITS2-denoised/heatmap.qzv

qiime gneiss balance-taxonomy --i-table /ITS2-denoised/sample-contingency-filtered-table.qza --i-tree /ITS2-denoised/hierarchy.qza --i-taxonomy /ITS2-denoised/ITS2-taxonomy.qza --p-taxa-level 2 --p-balance-name 'y9' --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --m-metadata-column Kasittely-Lajike --o-visualization /ITS2-denoised/y9_taxa_summary.qzv

ANCOM-analyysi

qiime taxa collapse --i-table /ITS2-denoised/features-samples-filtered-table.qza --i-taxonomy /ITS2-denoised/ITS2-taxonomy.qza --p-level 6 --o-collapsed-table /ITS2-denoised/features-samples-filtered-table-l6.qza

```
qiime composition add-pseudocount --i-table /ITS2-denoised/features-samples-filtered-table-l6.qza --o-composition-table /ITS2-denoised/comp-features-samples-filtered-table-l6.qza  
qiime composition ancom --i-table /ITS2-denoised/comp-features-samples-filtered-table-l6.qza --m-metadata-file /Huja_metadata.txt --m-metadata-column Kasittely-Lajike --o-visualization /ITS2-denoised/l6-ancom-Kasittely-Lajike.qzv
```